

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/81, C12P 21/02 C12N 1/19	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/10577 (43) Date de publication internationale: 25 juin 1992 (25.06.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/01008 (22) Date de dépôt international: 13 décembre 1991 (13.12.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/15602 13 décembre 1990 (13.12.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): EUROLYSINE [FR/FR]; 16, rue Ballu, F-75009 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : NICOLAS, Alain [FR/FR]; 11, rue F.-Villon, F-75015 Paris (FR). KUDLA, Bernard [FR/FR]; 58, rue du Flamant-Rose, F-91470 Limours-en-Hurepoix (FR). LABAT, Nathalie [FR/FR]; 2-4, boulevard Jourdan, F-75014 Paris (FR). PARDO, Daniel [FR/FR]; Château de Montebello, F-78350 Jouy-en-Josas (FR).		(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: MULTISITE INTEGRATION CASSETTE FOR THE GENOME OF A YEAST (54) Titre: CASSETTE D'INTEGRATION "MULTISITE" POUR LE GENOME D'UNE LEVURE <div style="text-align: center;"> </div>		
(57) Abstract <p>A multisite integration cassette in the genome of a yeast of the <i>Saccharomyces</i> is characterized in that it comprises at least: an integration sequence assuring homology with a naturally repeated non-essential sequence dispersed in the genome of the yeast; a sequence of interest. In particular, the integration sequence shows homology with a repeated, dispersed Solo Sigma sequence present in the genome of the yeast. Application to the synthesis of products of interest by yeast.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne une cassette d'intégration multisite dans le génome d'une levure du genre <i>Saccharomyces</i>, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins: une séquence d'intégration présentant de l'homologie avec une séquence non essentielle naturellement répétée et dispersée dans le génome de la levure, une séquence d'intérêt. Plus particulièrement, la séquence d'intégration présente de l'homologie avec une séquence répétée et dispersée Solo Sigma présente dans le génome de la levure. Application à la synthèse de produits d'intérêt par la levure.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brazil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU+	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

+ Toute désignation de "SU" produit ses effets dans la Fédération de Russie. On ignore encore si une telle désignation produit ses effets dans les autres Etats de l'ancienne Union soviétique.

CASSETTE D'INTEGRATION "MULTISITE" POUR LE GENOME D'UNE LEVURE

L'invention a pour objet une cassette d'intégration dans le génome d'une levure, des souches de levure transformées par ladite cassette, et un procédé de préparation de produits d'intérêt par une souche de levure ainsi transformée.

5 On entend par cassette d'intégration toute construction destinée à assurer l'intégration, dans le génome d'une levure, d'une séquence d'intérêt.

Différentes techniques d'intégration dans la levure ont déjà été proposées. Ainsi, HICKS et al (1) ont décrit des événements de transformation d'une levure par un plasmide conduisant par recombinaison homologue
10 entre une séquence présente dans le génome de la levure et une séquence portée par le plasmide, à une intégration dans le génome de la levure d'une séquence qui n'y était pas présente à l'origine.

Les méthodes proposées jusqu'à maintenant fondées sur la recombinaison homologue, ont conduit notamment à l'intégration multicopie en
15 tandem d'une séquence d'intérêt dans le génome de la levure. Cependant, ce type d'intégration peut être instable ce qui définit les limites de la technique envisagée pour augmenter les niveaux d'expression de la séquence d'intérêt malgré des taux de transformation tout à fait satisfaisants.

20 C'est le cas, par exemple de l'intégration de séquences d'intérêt dans les séquences répétées en tandem de l'ADN codant pour les ARN ribosomiques. Ces séquences sont présentes à environ 100 à 200 copies par cellule (2). Or de telles répétitions naturelles sont fréquemment soumises à des événements de recombinaison de type "crossing over" inégal entre les
25 chromatides soeurs tant en méiose qu'en mitose. En outre, des événements d'excision, dus à des recombinaisons intrachromosomiques entre éléments du tandem ont déjà été décrits, notamment par H.C. KLEIN et al. (3). Ce type de réarrangements peut conduire à une dérive génétique de la souche transformée et peut entraîner la perte de la séquence d'intérêt (4).

30 Il y a donc un besoin réel d'une méthode d'intégration dans la levure qui conduise à une intégration à la fois multiple et stable de la séquence d'intérêt dans le génome de la levure, permettant un accroissement sensible du niveau d'expression de la séquence d'intérêt.

Les inventeurs ont maintenant découvert qu'il est possible d'utiliser des séquences naturellement répétées et dispersées du génome d'une levure du genre *Saccharomyces* dont aucune fonction n'est décrite à ce jour. Cette séquence sera appelée "non essentielle" et sera utilisée pour mettre au point une nouvelle méthode d'intégration dans le génome d'une telle levure.

C'est pourquoi l'invention a pour objet une cassette d'intégration dans le génome d'une levure du genre *Saccharomyces*, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins :

- 10 - une séquence d'intégration présentant de l'homologie avec une séquence non essentielle naturellement répétée et dispersée dans le génome de la levure,
- une séquence d'intérêt.

Selon un mode de réalisation avantageux de la cassette d'intégration selon l'invention, elle comporte en tant que séquence d'intégration une séquence homologue d'une séquence type Solo LTR, en particulier une séquence Solo LTR, d'une levure du genre *Saccharomyces*, notamment de *S. cerevisiae*.

Les séquences Solo LTR sont issues d'éléments transposables de la levure. Les éléments transposables sont, dans le génome d'un micro-organisme donné, des séquences d'ADN capables de se déplacer d'une position à l'autre. Chez la levure, des éléments transposables identifiés comme rétrotransposons, transposent par un mécanisme qui utilise l'ARN.

Quatre types d'éléments transposables ont été décrits dans la levure. Ils sont désignés par Ty1, Ty2, Ty3 et Ty4.

Chacun de ces éléments est composite et consiste en une région interne de plusieurs kb, flanquée de LTR (Long Terminal Repeat) de plusieurs centaines de paires de bases chacun (figure 1). Les extrémités de ces LTR sont des séquences de répétition inversées, allant jusqu'à 10 pb.

La transposition des Ty se produit par l'intermédiaire d'un ARN transcrit d'un LTR à l'autre et possédant une répétition terminale de 45 pb. Après transcription reverse de cet ARN, l'ADN copié est intégré au génome,

produisant une duplication de 5 pb de la cible chromosomique de part et d'autre du Ty (5). Par recombinaison homologue entre ses LTR, le Ty peut s'exciser et laisse au niveau de son intégration une séquence LTR appelée "Solo LTR", entourée de la duplication de 5 pb. Ces éléments Solo sont à eux seuls incapables de transposer.

Les rétrotransposons Ty1 et Ty2 sont structurellement proches. Ils possèdent un domaine interne epsilon de 5,3 kb et deux séquences flanquantes de répétition directe, appelées éléments delta de 334 à 338 pb. Ils sont présents à raison de 30-35 copies par génome haploïde. Ils se transposent en s'insérant fréquemment dans la région 5' des gènes et en induisant généralement des mutations d'expression (6,7).

Le rétrotransposon Ty3 présente par contre des homologies de séquence limitées avec les séquences de Ty1 et Ty2 (8). On a décrit de 1 à 4 éléments Ty3 par cellule, sans avoir constaté de mutation due à la transposition d'un élément Ty3. Le Ty3 est un élément de 5,4 kb composé d'un domaine interne de 4,7 kb et de séquences LTR de 340 pb appelées séquences Sigma.

Enfin, on a dénombré environ 1 à 4 copies d'éléments Ty4 par cellule. Les séquences flanquantes correspondantes sont appelées éléments Tau.

Le génome de la levure *S. cerevisiae* contient en outre environ 100 copies de séquences Solo Delta non associées avec les éléments Ty1 et Ty2. Ces séquences Solo Delta montrent entre elles des divergences de séquence pouvant aller de 10 à 40% (9). Elles peuvent se rencontrer en groupes de quatre à cinq éléments, et se retrouvent parfois dans les quelques centaines de bases qui précèdent les ARNt (10). Elles résultent probablement de l'excision de la région interne du Ty par recombinaison homologue entre ses deux séquences Delta flanquantes.

De la même façon, on trouve dans le génome de *S. cerevisiae* des séquences Solo Sigma ou Tau.

Ces séquences Solo LTR sont particulièrement intéressantes comme séquences d'intégration dans la mesure où elles ne présentent aucune

fonction essentielle pour la levure du genre *Saccharomyces*; par ailleurs, elles possèdent une stabilité naturelle dont peut bénéficier la séquence intégrée. Sans lier les résultats observés par la mise en oeuvre de l'invention à des hypothèses théoriques, on peut rappeler ici qu'il apparaît
5 désormais vraisemblable que des mécanismes cellulaires contrôlent la recombinaison, et donc la stabilité de ces séquences naturellement répétées. Ces mécanismes impliqueraient par exemple des topoisomérases spécifiques.

Suivant une forme de réalisation avantageuse de la cassette
10 d'expression selon l'invention, elle comprend une séquence d'intégration homologue d'une séquence Solo Sigma.

Selon les souches de levure étudiées, on compte environ 30 copies de séquences Solo Sigma. Elles présentent entre elles une forte conservation de séquence puisque le maximum de divergence constaté entre deux
15 séquences est de 2,5% (11). A la différence des Solo Delta, les Solo Sigma présentent une étroite association avec le ARN de transfert (ARNt). En particulier, elles sont toujours situées à une distance de 16 à 19 pb en 5' du point d'initiation de transcription d'un ARNt et aucune interaction entre l'élément Sigma et l'expression de l'ARNt ne semble se produire.

20 Le fait que les Solo Sigma présentent une forte homologie de séquence entre elles, doit permettre, par l'utilisation d'un Solo Sigma donné, de cibler les constructions pour l'intégration dans les autres Solo Sigma de façon équivalente.

Il devient ainsi possible, avec une seule étape de transformation de
25 prévoir l'intégration d'une séquence d'intérêt à différents loci spécifiques dispersés dans le génome de la levure, et correspondant à différentes séquences Solo Sigma.

D'autre part, leur localisation stricte, c'est-à-dire toujours à une distance de 16 à 19 pb en 5' de gènes codant pour différents ARNt permet
30 de prévoir l'environnement chromosomique des séquences d'intérêt intégrées à leur niveau.

Enfin et surtout, leur étroite association avec les ARNt exprimés suggère qu'il est possible de maintenir un Solo Sigma au voisinage direct

d'une séquence fortement transcrite. Ainsi, une séquence d'intérêt introduite à ce niveau, à proximité d'un gène essentiel, bénéficiera probablement d'une forte sélection contre tout événement majeur de remaniement qui affecterait l'expression de l'ARNt.

- 5 On citera plus particulièrement la séquence Solo Sigma localisée sur le chromosome VIII de *S. cerevisiae* à proximité du gène ARG4.

Pour préparer la cassette d'intégration, on peut partir d'une séquence Solo LTR localisée sur un chromosome de la levure à transformer, et modifier cette séquence en utilisant des techniques connues de l'homme du
10 métier pour produire un fragment d'ADN comportant une séquence d'intérêt et apte à transformer une levure du genre *Saccharomyces*.

Ces modifications doivent permettre :

- (i) de sous-cloner et d'isoler la séquence Solo LTR à l'exclusion de toute autre séquence chromosomique,
- 15 (ii) de cloner une séquence d'intérêt à l'intérieur de cette séquence Solo LTR,
- (iii) par simple restriction, d'isoler un fragment d'ADN comportant une séquence Solo LTR interrompue par toute séquence d'intérêt à l'exclusion de toute séquence bactérienne.

20 Pour permettre sa sélection et son amplification dans les souches bactériennes, on associe au fragment d'ADN ainsi préparé des fragments d'ADN bactérien comportant en particulier une origine de répllication bactérienne et un gène de sélection, par exemple un gène de résistance à un antibiotique.

25 D'une manière générale, la séquence d'intérêt peut coder pour tout produit d'intérêt : protéine, enzyme ou autre. Elle peut être hétérologue ou homologue, suivant que l'on désire faire produire à la levure un produit qu'elle ne produit pas naturellement, ou encore accroître le niveau d'expression d'un produit fabriqué naturellement par la levure.

30 C'est pourquoi l'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un produit d'intérêt par une levure du genre *Saccharomyces* par transformation d'une levure avec une cassette d'intégration selon l'invention.

Bien évidemment, il est également possible de faire comporter à la cassette d'intégration selon l'invention plusieurs séquences d'intérêt de façon à permettre l'intégration puis l'expression de plusieurs séquences. Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux lorsqu'on souhaite
5 faire produire simultanément à une levure plusieurs protéines utiles, ou encore plusieurs enzymes codés par des gènes d'une voie de biosynthèse pour la préparation d'un métabolite particulier.

Suivant un autre mode de réalisation de l'invention, on utilise la cassette d'intégration selon l'invention pour faire des intégrations
10 séquentielles de diverses séquences d'intérêt dans le génome de la levure. En particulier, comme dans le cas précédent, cette méthode peut être utile pour l'intégration de plusieurs gènes d'une voie de biosynthèse d'un métabolite particulier.

C'est pourquoi l'invention a également pour objet un procédé de
15 préparation de plusieurs produits d'intérêt, par une levure du genre *Saccharomyces* selon lequel :

- on transforme successivement une levure du genre *Saccharomyces* avec des cassettes d'intégration selon l'invention, comportant chacune en tant que séquence d'intérêt une séquence d'ADN codant pour l'un des produits
20 d'intérêt, ou
- on transforme une levure du genre *Saccharomyces* avec une cassette d'intégration selon l'invention comportant plusieurs séquences d'intérêt codant chacune pour l'un des produits d'intérêt,
- on met en culture la souche de levure ainsi transformée, et
25 - on récupère ledit métabolite.

Pour la mise en oeuvre de l'invention, la séquence d'intérêt est de préférence clonée à l'intérieur de la séquence d'intégration.

Selon un autre aspect de l'invention, la levure du genre *Saccharomyces* permettant la préparation de plusieurs produits d'intérêt est obtenue
30 par croisement génétique entre deux souches parentales portant chacune un sous-ensemble des gènes d'intérêt, les gènes étant intégrés aux sites des séquences naturellement répétées par l'intermédiaire d'une cassette d'intégration multisite selon l'invention. La recombinaison génétique des

caractères parentaux conduit à des souches filles réunissant les différentes séquences d'intérêt, intégrées aux sites des séquences naturellement répétées, et portant donc l'ensemble des gènes d'intérêt.

Un tel mécanisme est mis en évidence notamment à l'exemple 11C2.

5 Une souche de levure du genre *Saccharomyces* permettant la préparation de plusieurs produits d'intérêt peut, selon encore un autre aspect de l'invention, être obtenue par cotransformation d'une souche de levure par plusieurs cassettes d'intégration selon l'invention, portant différents gènes d'intérêt. On peut également réaliser la cotransformation
10 d'une levure du genre *Saccharomyces* par une cassette d'intégration selon l'invention et un vecteur sélectionnable.

Ces différents modes d'obtention peuvent être utilisés successivement, en association, pour aboutir à une levure portant l'ensemble des gènes d'intérêt désirés.

15 L'invention concerne également une souche de levure transformée par une cassette d'intégration selon l'invention. Plus particulièrement, elle a pour objet une souche de levure du genre *Saccharomyces* qui contient dans son génome au moins une séquence d'intérêt intégrée en une seule copie dans au moins une séquence non essentielle naturellement répétée, et
20 dispersée dans son génome, au site de ladite séquence naturellement répétée. Il s'agit notamment d'une souche de *S.cerevisiae* pour laquelle ladite séquence naturellement répétée et dispersée dans son génome est une séquence Solo Sigma.

L'intégration, conformément à l'invention, des séquences d'intérêt
25 spécifiquement au site de la séquence naturellement répétée présente des avantages certains par rapport aux constructions ayant déjà pu être décrites.

En effet les copies du gènes d'intérêt sont ciblées et intégrées en différents points non voisins sur l'ADN hôte. En outre, on sait que les sites
30 d'intégration ne sont pas essentiels à la levure, et on ne court pas le risque, grâce à la spécificité du ciblage lors de cette intégration, de provoquer la l'inactivation partielle ou totale d'un gène indispensable à la cellule.

La transformation des levures par la cassette d'intégration selon l'invention peut se faire par différentes méthodes, notamment par électroporation.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront au cours de la description détaillée suivante d'exemples de réalisation, accompagnés des figures 1 à 23, qui montrent :

- Figure 1 : la structure générale d'un rétrotransposon Ty de levure.
- Figure 2 : la carte physique de la région chromosomique autour des séquences Solo Sigma portées par le chromosome VIII de *S. cerevisiae*, à proximité du gène ARG4.
- Figure 3 : la séquence nucléotidique de la région du chromosome VIII de *S. cerevisiae* située à 4 kb en 5' du gène ARG4. Sous la séquence sont indiquées les différences constatées avec la séquence Solo Sigma la plus fréquemment obtenue.
- Figure 4 : l'analyse par autoradiographie du contenu en séquences Solo Sigma des souches de *S. cerevisiae*, OLI, MGD131 102A et YNN295.
- Figure 5 : les différentes étapes conduisant par mutagenèse dirigée à l'introduction, de part et d'autre des séquences répétées inversées qui bordent l'élément Sigma VIII.1, de sites de restriction permettant le clonage précis de la séquence Sigma à l'exclusion de toute autre séquence chromosomique.
- Figure 6 : les différents oligonucléotides nécessaires pour introduire, par une technique de mutagenèse par PCR, des sites de restriction au centre de la séquence Sigma clonée dans le plasmide pBK605, pour permettre le clonage d'une séquence d'intérêt à cette position.
- Figure 7 : la structure des plasmides pBK609, pBK610 et pBK614.
- Figure 8 : la séquence nucléotidique du fragment ClaI-HinDIII du plasmide pBK610.

- Figure 9 : la structure du plasmide pBK617.
- Figure 10 : la structure des plasmides pBK611, pBK615 et pBK616.
- Figure 11 : structure des plasmides pBK620 et pBK623
- Figure 12 : une autoradiographie des chromosomes des transformants
5 ORT786.1 à ORT786.9 par une sonde spécifique URA3.
- Figure 13 : une autoradiographie des chromosomes des transformants
 ORT731 à ORT740 par une sonde spécifique URA3.
- Figure 14 : une autoradiographie des chromosomes des transformants
 ORT720 à ORT730 par une sonde spécifique ARG4.
- 10 - Figure 15 : figure 15a) : la structure et les séquences bordantes du
 fragment SmaI-HindIII du plasmide pBK611.
 figure 15b) : l'analyse par Southern des transformants ARG⁺
 obtenus.
- Figure 16 : la technique utilisée pour déterminer les modalités d'inté-
15 gration appelée amplification par PCR inverse, ainsi que les
 séquences génomiques des transformants ORT724 et ORT723.
- Figure 17 : l'analyse par autoradiographie des chromosomes des
 transformants ORT1304, ORT1305 et ORT1306.
- Figure 18 : l'analyse par autoradiographie des chromosomes de différents
20 surtransformants ARG⁺ URA⁺ à l'aide d'une sonde spécifique
 URA3 et ARG4 (surtransformants ORT720.6, 720.7, 720.8,
 723.8, 723.9).
- Figure 19 : la même analyse qu'à la figure 17, sauf qu'elle concerne les
 surtransformants ORT740.1, 740.2, 740.3.
- 25 - Figure 20 : l'analyse par autoradiographie des chromosomes des
 transformants ORT 1320-X.
- Figure 21 : l'analyse par autoradiographie des chromosomes des
 transformants ORT 1327-X.
- Figure 22 : la même analyse qu'aux figures 17 et 18, sauf qu'elle
30 concerne les cotransformants ORT746, 747, 748, 749, 751,
 752, 753.

EXEMPLE 1

Clonage et caractérisation d'un élément Sigma porté par le chromosome VIII de *S. cerevisiae*, à proximité du gène ARG4

Il fut détecté par hybridation à l'aide d'une séquence spécifique isolée à partir d'une séquence Sigma connue (11), puis l'existence d'un site de restriction XhoI caractéristique de l'élément Sigma a permis de préciser sa localisation à 4 kb en 5' du gène ARG4.

La carte de restriction de la région chromosomique correspondante est donnée à la figure 2.

On utilise le fragment de restriction BamHI-PstI provenant du plasmide p(spo13)2 (12) de 4 kb contenant l'élément Sigma (figure 2) pour générer différents fragments de restriction : XhoI-BglII (0,8 kb), BglII-XhoI (1,7 kb) et BglII-EcoRI (2,1 kb). Ces fragments sont ensuite sous-clonés chacun dans un vecteur de type BluescriptKS⁻ (Stratagène) pour donner respectivement les plasmides pBL1, pBL4 et pBL6.

Ces différents plasmides permettent d'obtenir de l'ADN simple brin et sont séquencés par la technique de Sanger à partir de l'oligonucléotide amorce T3.

La séquence nucléotidique de la zone du chromosome VIII au voisinage du gène ARG4 obtenue est présentée à la figure 3.

Cette séquence nucléotidique présente au niveau du site XhoI considéré, de la position 258 à la position 598, les 341 paires de base correspondant aux séquences classiques d'un élément Sigma. Ce fragment sera ultérieurement utilisé pour diriger l'intégration. En particulier, on note de la position 258 à 265 et de la position 591 à 598 les séquences répétées inversées TGTTGTAT et ATACAACA qui correspondent aux bornes caractéristiques de cet élément.

De plus, l'élément est bordé par la duplication de la séquence GAATG répétée en orientation directe. Cette séquence GAATG n'est pas spécifique de l'élément Sigma, mais spécifique du locus d'intégration. Cette duplication de 5bp de part et d'autre d'un élément Sigma est le signe de l'excision du TYIII par recombinaison intramoléculaire entre ses LTR Sigma. Nous avons donc à ce locus un élément "Solo Sigma". Par ailleurs, on trouve de la position 241 à 169 les séquences d'un gène d'ARN de transfert.

Il s'agit du gène codant pour l'ARNt Ala, isoaccepteur majoritaire reconnaissant le codon AGC. On constate que l'élément Sigma se trouve 16 paires de bases en 5' du point d'initiation de transcription de cet ARNt.

5 Dans la suite de la description, chaque élément Sigma identifié est désigné par SigmaXXX.xx, où XXX en chiffre romain spécifie le numéro du chromosome portant le Sigma et xx en chiffre arabe spécifie le Sigma sur un chromosome donné. Par exemple, la séquence obtenue provient du SIGMAVIII.1.

10 En comparant la séquence de ce SIGMAVIII.1 avec celles des différents Sigma clonés aléatoirement par Sandmeyer (11), on observe une correspondance avec le clone n° 7 de Sandmeyer. On constate en outre que SIGMAVIII.1 présente 9 singularités de séquence par rapport à la séquence majoritairement obtenue par Sandmeyer (ces singularités de séquence sont signalées par l'indication sous la séquence des bases correspondantes de 15 Sandmeyer - figure 3). Cette divergence représente 9 nucléotides sur 341, soit 2,6%.

EXEMPLE 2

20 Caractérisation du contenu en séquences Sigma du génome de *Saccharomyces cerevisiae*

On étudie les souches de *Saccharomyces cerevisiae* OLI, MGD131 102A utilisées ultérieurement comme réceptrices de transformation.

Ces souches présentent les génotypes suivants :

25 OLI : Mat α , his3-(11,15), leu2-(3,112), ura3-(257,373), gal2.
MGD131 102 A : Mat a, his3-1, ade2, arg4- Δ 2060, ura3-52, trp1-289.
L'analyse de ces souches est effectuée en séparant les chromosomes par électrophorèse en champs pulsés (CHEF DR II, Bio-Rad), puis les chromosomes une fois séparés sont transférés sur membrane de nylon 30 Hybond N⁺ (Amersham). Le filtre obtenu est hybridé à l'aide du fragment ClaI-HindIII provenant du plasmide pBK605 et marqué au ³²P par "Random Priming". Ce fragment porte uniquement les séquences SIGMAVIII.1 (figure 6).

La construction du plasmide pBK605 est décrite de façon détaillée à l'exemple 3.

On constate sur les autoradiographies présentées à la figure 4 que dans la souche OL1 comme dans la souche MGD131 102A, les trois
5 chromosomes VI, X et XIII sont dépourvus d'éléments Sigma, que les chromosomes I, III, IX, XI et II semblent ne porter qu'un élément, et que les autres chromosomes en portent plusieurs. On constate que le chromosome VIII, à partir duquel VIII.1 a été isolé, semble porter plusieurs éléments.

On constate que dans la souche de *S. cerevisiae* YNN295 (BioRad),
10 utilisée comme marqueur de migration chromosomique, le contenu en Sigma diffère de celui obtenu avec les souches OL1 et MGD131 102A. Le résultat peut varier d'une souche à l'autre tant pour les chromosomes qui portent des Sigma que pour le nombre de Sigma présents par chromosome.

Enfin, le résultat obtenu montre que le SIGMAVIII.1 choisi permet
15 d'hybrider un nombre d'éléments estimés à une trentaine par génome haploïde. Il devrait donc permettre de diriger l'intégration d'une séquence d'intérêt dans les autres Solo Sigma.

EXEMPLE 3

20 Construction des vecteurs intégratifs pBK610 et pBK614

1 - MUTAGENES DIRIGES DU SIGMAVIII.1

La première mutagenèse consiste à introduire de part et d'autre des
séquences répétées inversées qui bordent l'élément SIGMAVIII.1 des sites de
25 restriction permettant le clonage précis de cet élément à l'exclusion de toute autre séquence chromosomique.

Pour ce faire, on effectue l'amplification des séquences de
SIGMAVIII.1 par P.C.R. (Polymerase Chain Reaction) en utilisant les
oligonucléotides amorce mutagènes A et B détaillés à la figure 5. La
30 construction initiale utilisée pour cette mutagenèse est le plasmide pBL6 porteur du fragment chromosomique BglII-EcoRI de 2,1 kb contenant le SIGMAVIII.1.

L'amplification conduit à la synthèse du fragment d'ADN compris entre les deux oligonucléotides amorce utilisés. L'incorporation physique des oligonucléotides A et B lors de cette synthèse conduit à la création de sites SpeI, EagI, ClaI directement en 5' des séquences Sigma et de sites HindIII, Sall et XbaI directement en 3' desdites séquences.

Le mélange réactionnel (100µl) pour la réaction PCR comprend :

- 53 µl d'eau désionisée et stérile
- 10 µl de tampon 10x : 0,5M KCL
 - 0,1M Tris-Cl pH8,3
 - 15 mM MgC₂
 - 0,1% (m/v) gélatine
- 16 µl des quatre dNTPs (1,25 mM de chaque)
- 5 µl de l'oligonucléotide A (20 µM)
- 5 µl de l'oligonucléotide B (20 µM)
- 10 µl du plasmide pBL6 (50 ng)

Le mélange est incubé à 100°C pendant 3 minutes, puis refroidi dans la glace. On ajoute ensuite 1 µl (5 U) de l'ADN Taq polymérase thermostable au mélange. Celui-ci est ensuite recouvert de 200 µl d'huile minérale.

On effectue la réaction d'amplification dans un Cycleur thermique à ADN de Perkin Elmer Cetus pendant 25 cycles, un cycle comprenant :

- une étape de dénaturation de l'ADN pendant 2 minutes à 94°C
- une étape d'hybridation pendant 2 minutes à 37°C
- une étape de polymérisation pendant 2 minutes à 72°C.

Après 25 cycles, on effectue une étape de polymérisation de 20 minutes à 72°C afin de terminer les synthèses interrompues.

On sépare une partie du produit de l'amplification (20 µl) par électrophorèse en gel d'agarose. Le fragment d'ADN de 350 bp obtenu est ensuite purifié par adsorption sur billes de verre, repris en TE et restreint par les enzymes SpeI et Sall.

Ce fragment restreint est ensuite cloné dans un vecteur M13mp18 ouvert par les enzymes XbaI et Sall pour donner le plasmide pBK605 (voir figure 6).

La seconde mutagénèse entreprise a pour but de créer des sites de restriction au centre de l'élément Sigma de façon à permettre le clonage de séquences d'intérêt à cette position.

5 Pour ce faire, on effectue deux amplifications P.C.R. indépendamment à partir du plasmide pBK605 (figure 6).

La première de ces amplifications comporte un oligonucléotide mutagène SigB central à l'élément Sigma et un oligonucléotide non mutagène REV situé dans le vecteur en amont du Sigma.

10 La seconde amplification est réalisée avec l'oligonucléotide mutagène SigA complémentaire de SigB et un oligonucléotide non mutagène UN situé dans le vecteur en aval du Sigma.

La structure des oligonucléotides SigA et SigB est donnée à la figure 6.

15 De la sorte, les deux moitiés de l'élément Sigma sont synthétisées avec pour chacune d'elles deux nouveaux sites : BalI ou EaeI et StuI.

Les produits de ces deux synthèses sont purifiés sur gel d'agarose.

Le fragment d'ADN obtenu lors de la première amplification est restreint par les enzymes SmaI et StuI puis cloné dans un Bluescript Ks⁺ ouvert par l'enzyme SmaI pour donner le plasmide pBK609 (figure 7).

20 Le fragment d'ADN obtenu lors de la seconde amplification est restreint par les enzymes SalI et StuI. Ce fragment est ensuite cloné dans le plasmide pBK609 d'abord ouvert par l'enzyme HindIII et traité par la Polymérase I fragment de Klenow, puis restreint par l'enzyme SalI.

Le plasmide résultant, pBK610 est présenté à la figure 7.

25 Le fragment de restriction ClaI-ClaI obtenu du plasmide pBK610 est introduit au site ClaI d'un plasmide dérivé du Bluescript KS⁺ dépourvu des sites SmaI, PstI, EcoRI et EcoRV.

Le plasmide pBK614 ainsi obtenu est présenté à la figure 7.

30 Dans ce dernier plasmide, les duplications des sites BamHI et EagI sont supprimées, et l'élément Sigma est maintenant directement encadré de sites HindIII et ClaI.

Le fragment ClaI - HindIII du plasmide pBK610 a été séquencé et la séquence est présentée en figure 8.

L'analyse de cette séquence montre que l'élément Sigma muté est maintenant directement bordé de sites de restriction et qu'il possède en son milieu quatre sites uniques :

BalI ou EaeI, PstI, EcoRI et EcoRV.

5 Il faut noter que les 38 nucléotides porteurs de ces sites de restriction, soit la séquence :

CCAAAGAGGGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTCCT

sont introduits en lieu et place des 12 nucléotides centraux TCGAAGCGGA du SIGMAVIII.1.

10 Ces nucléotides hétérologues sont représentés en italiques dans la figure 8.

L'élément Sigma muté résultant est appelé SIGMAVIII.1*.

EXEMPLE 4

15 Construction d'un vecteur intégratif contenant le gène URA3 de S. cerevisiae

L'ADN du fragment de restriction EcoRI-NsiI (1,1 kb) contenant le gène URA3 (13) est purifié et introduit dans le plasmide pBK614 ouvert
20 par les enzymes EcoRI et PstI.

Le plasmide pBK617 résultant est présenté à la figure 9.

EXEMPLE 5

25 Construction de vecteurs intégratifs contenant le gène ARG4 de S. cerevisiae

L'ADN du fragment HpaI-HpaI de 2060 pb du génome de S. cerevisiae contenant l'unité transcriptionnelle ARG4 (figure 2) est cloné au site SmaI du polylinker des plasmides pUC18 et pUC19. Les fragments EcoRI-PstI (2,1 kb) des plasmides résultant de ces clonages sont purifiés et insérés dans les
30 plasmides pBK610 et pBK614 ouverts par les enzymes EcoRI et PstI. Les plasmides pBK611, pBK615 et pBK616 résultants de ces constructions sont présentés à la figure 10.

EXEMPLE 6

Construction de vecteurs intégratifs contenant les gènes mutés *arg4*-EcoRV et *arg4*-BglIII de *S. cerevisiae*

- 5 L'ADN du fragment de restriction HpaI-HpaI de 2060 paires de bases contenant le gène ARG4 muté soit *arg4*-EcoRV, soit *arg4*-BglIII (Nicolas et al. 1989), purifié respectivement des plasmides pNPS308 et pMY232 est cloné au site EcoRV du plasmide pBK614. Les plasmides pBK620 et pBK623
- 10 résultants de ces constructions sont présentés dans la figure 11. Ces cassettes sont appelées Sigma::*arg4* car elles contiennent des formes mutées du gène ARG4.

EXEMPLE 7

- Transformation de la souche OLI par le fragment Sigma::URA3
- 15 (SIGMA VIII.1* interrompu par le gène URA3)

- La souche réceptrice OLI, porteuse de la mutation *ura3*-(257,373) est transformée par électroporation (Bio-Rad GenePulser) avec le fragment
- 20 HindIII-HindIII de 1,4 kb (Sigma::URA3), purifié d'un gel d'agarose après la digestion du plasmide pBK617.

Pour ce faire, 80 ml d'une culture en YPD parvenue à 2×10^7 cellules/ml sont centrifugés 5 minutes à 3500 tpm. Le culot cellulaire est repris en 8 ml de Dithiothréitol 25 mM.

- Les cellules sont gardées à température ambiante 20 à 25 minutes
- 25 puis recentrifugées.

Le culot est repris en 800 μ l (soit 10^9 cellules/ml) en tampon d'électroporation :

- Sucrose 270 mM
- Tris-Cl 10 mM pH8
- 30 - $MgCl_2$ 0,1 mM

Dans une cuvette d'électroporation de 2 mm on place :

- 100 μ l de cellules (10^8 cellules)
- 10 μ l du fragment purifié (de 100 à 500 ng)
- 1 μ l d'ADN entraîneur (10 μ g d'ADN de thymus de veau soniqué).

La cuvette est placée dans la chambre d'électroporation et est soumise à une décharge électrique selon les conditions :

- voltage 450 V/cm
- capacitance 250 μ F
- 5 - dérivation 200 Ω .

On ajoute immédiatement après le choc 400 μ l d'eau stérile à température ambiante dans la cuvette afin de refroidir le mélange. De 100 à 500 μ l du mélange sont ensuite étalés sur milieu sélectif et les cellules sont laissées 48 h à 30°C.

10 De la sorte, de 300 à 600 transformants URA⁺ sont obtenus par microgramme de fragment linéaire sur milieu sélectif sans uracile.

L'analyse de 9 transformants URA3⁺ (désignés ORT 786.1 à 786.9) choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert et hybridation du filtre obtenu à l'aide d'une sonde spécifique constituée du
15 fragment HindIII-HindIII du gène URA3 (13).

Le résultat de cette hybridation est présentée sur la figure 12.

On constate que sur cette autoradiographie tous les transformants analysés présentent un signal au niveau du chromosome V, porteur des séquences mutantes ura3-(257,373), comme cela est observé pour la souche
20 réceptrice OL1. D'autre part, les transformants ORT786.1, .2, .4, .6, .8 et .9 portent une copie additionnelle de la séquence URA3 dispersée respectivement aux chromosomes XV ou VII, XIV, II, IX, XV ou VII. Pour les transformants ORT786.3, .5, .7 aucune bande additionnelle n'est visible. Ceci peut s'expliquer soit par une conversion génique de l'allèle mutant
25 ura3-(257,373) vers la forme sauvage, soit par l'intégration d'une copie additionnelle de la séquence URA3 au chromosome V ou VIII.

EXEMPLE 8

Transformation de la souche MGD131 102A par le fragment Sigma::URA3
30 (Sigma VIII.I* interrompu par le gène URA3).

Afin de pouvoir généraliser les résultats décrits précédemment, l'étude a été poursuivie dans une autre souche modèle MGD131 102A.

Cette souche, présentant la mutation *ura3-52*, a été transformée comme précédemment par électroporation à l'aide du fragment purifié HindIII-HindIII de 1,4 kb (Σ URA3) issu de la restriction du plasmide pBK617. Les transformants URA⁺ obtenus (de 150 à 350 par μ g d'ADN) sont

5 sélectionnés sur milieu sans uracile.

L'analyse de 10 transformants URA⁺ (désignés par ORT731 à ORT740), choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert et hybridation du filtre obtenu à l'aide d'une sonde spécifique URA3 (figure 13).

10 On observe l'intégration d'une copie additionnelle URA3 dans tous les transformants analysés et ceci à différents chromosomes selon les transformants, soit au chromosome VIII pour ORT733, 736 et 738, soit au chromosome XVI pour ORT735, soit au chromosome XV pour ORT732, 736, 737 et 739 et soit au chromosome XII pour ORT734.

15 Dans chaque transformant on révèle en plus la copie du gène muté *ura3-52* située au chromosome V.

Ce résultat montre que le système utilisé "un gène dans un élément Sigma" permet de disperser une séquence d'intérêt dans le génome d'une deuxième souche et démontre que l'invention est potentiellement utilisable

20 dans toute souche porteuse d'éléments Solo Sigma répétés et dispersés.

EXEMPLE 9

Transformations de la souche MGD131 102A par le fragment Σ ARG4 (Σ VIII.I* interrompu par le gène ARG4)

25 Afin de généraliser l'utilisation de l'invention de la cassette d'intégration multisite à une autre séquence d'intérêt, la souche réceptrice MGD131 102A porteuse de la mutation *arg4-Δ2060* est transformée comme précédemment par électroporation à l'aide du fragment de restriction SmaI-HindIII de 2,5 kb (Σ ARG4) provenant de la digestion du plasmide pBK611, voir figure 10.

30 De 150 à 1 200 transformants par μ g de fragment sont obtenus sur milieu sélectif sans arginine.

L'analyse de 10 transformants ARG⁺ (désignés par ORT720 à ORT729), choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert et hybridation du filtre obtenu à l'aide d'une sonde spécifique ARG4.

La sonde utilisée est le fragment HpaI-HpaI de 2060 pb qui contient l'unité transcriptionnelle ARG4 (figure 2) et qui correspond exactement à la délétion 2060 de la souche réceptrice. De la sorte, ne sont révélées par hybridation que les copies du gène introduites lors de la transformation.

Le résultat de cette hybridation est présenté à la figure 14.

Sur cette autoradiographie on constate plusieurs faits :

- le gène ARG4 est présent sur différents chromosomes selon les transformants (IX pour ORT720; VIII pour ORT721, 724 et 728; II pour ORT722, 723 et 730; XV ou VII pour ORT725; XII ou IV pour ORT726 et 729).

- l'intensité du signal d'hybridation obtenu est variable : plus importante pour ORT722 et 723, faible pour ORT729 bien que ce transformant soit phénotypiquement ARG⁺.

Afin de préciser la structure et le nombre de copies intégrées du fragment Sigma::ARG4, l'ADN total des transformants ORT720, 722 et 724 est extrait et analysé par Southern par une simple restriction ClaI, BglII et BamHI et par une double restriction XhoI+NdeI (figure 15).

La sonde utilisée est le fragment HpaI-HpaI de 2060 pb, spécifique du gène ARG4.

Tous les transformants analysés présentent une bande unique XhoI-NdeI de 2,45 kb, comme attendu par la digestion XhoI-NdeI du plasmide pBK611.

L'analyse des résultats obtenus pour ORT724 (deux bande de 2,35 et 2,75kb avec BglII et une bande de 4,45 kb avec BamHI) sont compatibles avec l'existence d'une intégration en copie unique du gène ARG4 dans le Sigma VIII.I de départ (voir la carte de restriction de cette région figure 2). Les profils de restriction BglII et BamHI des transformants ORT720 et 722 similaires à celui de ORT724 tendent à montrer qu'une intégration en copie unique du gène ARG4 s'est produite dans ces transformants.

Les résultats obtenus montrent que le système utilisé "un gène dans un élément Sigma" permet de disperser dans le génome un second type de séquence d'intérêt.

5 Afin de déterminer précisément les modalités d'intégration de deux des transformants obtenus (ORT723 et ORT724), l'ADN bordant chaque insertion du côté du site XhoI est amplifié par une méthode dite "inverse P.C.R.", puis le fragment amplifié obtenu est séquencé. L'obtention d'un fragment d'amplification unique pour ces deux transformants suggère l'intégration d'une seule copie dans le génome.

10 La technique d'amplification et les séquences obtenues sont présentées à la figure 16.

Pour ORT724, dont le fragment Sigma::ARG4 est intégré au chromosome VIII, la séquence lue révèle que :

15 - tous les nucléosides spécifiques du SIGMAVIII.1 de la position 347 à la position 258 sont retrouvés.

- tous les nucléotides hétérologues localisés en 5' du site XhoI initialement présents dans le fragment SmaI-HindIII sont délétés, en particulier la séquence correspondant au site de restriction ClaI (figure 16).

20 De plus, les 180 pb adjacentes à l'élément Sigma::ARG4 intégré correspondent exactement à celles initialement décrites pour la région flanquante du SIGMAVIII.1 de la position 77 à la position 257. Ces 180 pb couvrent le tARN Ala associé au SIGMAVIII.1 (figure 3).

25 Ceci démontre que l'intégration du fragment Sigma::ARG4 s'est bien produit dans le transformant ORT724 par recombinaison homologue avec le SIGMAVII.1 de départ.

Pour le transformant ORT723, dont le fragment Sigma::ARG4 est intégré dans le chromosome II, la séquence montre que :

30 - les nucléotides spécifiques d'un Sigma sont retrouvés jusqu'à l'extrémité de la séquence inversée répétée TGTTGTA. De même manière que précédemment, tous les nucléotides hétérologues qui bordent le fragment SmaI-HindIII utilisé pour la transformation sont délétés. Une nouvelle

séquence chromosomique inconnue démarre au ras de la séquence Sigma::ARG4 intégralement préservée. De plus, à 16 pb en 5' du Sigma::ARG4 intégré, on observe une séquence correspondant à un ARNt Ala.

5 Enfin, la séquence spécifique du Sigma présente deux caractéristiques importantes :

- à la position 343 on trouve le nucléotide G qui singularise le SIGMAVIII.1 (figure 3).

10 - aux positions 307 et 309, on trouve respectivement deux nucléotides A à la place des nucléotides C et G qui singularisent le SIGMAVIII.1, et qui étaient initialement présents dans la séquence du fragment SmaI-HindIII utilisé pour la transformation.

15 Ces résultats démontrent que dans le transformant ORT723 l'intégration du fragment Sigma::ARG4 s'est produite par recombinaison homologue dans un Sigma chromosomique préexistant, comme dans le cas précédent. De ce fait, pour ORT723, il est possible de préciser que la recombinaison s'est probablement effectuée entre les nucléotides 309 et 343 des éléments Sigma impliqués.

20 EXEMPLE 10

Transformation des souches MGD131 2C et MGD131 102A par le fragment Sigma::arg4-EcoRV. (SIGMA VIII.1* interrompu par le gène arg4-EcoRV)

25 Les souches réceptrices MGD131 2C et MGD 131 102A porteuses de la mutation arg4-Δ2060 sont cotransformées par électroporation à l'aide du fragment de restriction HindIII-HindIII de 2.4 kilobases purifié du plasmide pBK620 et d'un microgramme d'un plasmide réplcatif de levure contenant un marqueur de sélection, soit le gène LEU2 pour transformer la souche MGD131 2C soit le gène HIS3 pour transformer la souche MGD131 102A.

30 Les transformants sont sélectionnés sur milieu sélectif respectivement sans leucine ou sans histidine et analysés par un test de papillation mitotique en utilisant une souche testrice arg4-BglIII de signe sexuel compatible qui

permet de cribler les cotransformants ayant intégré le fragment Sigma::arg4-EcoRV (Nicolas et al. 1989). Le plasmide réplcatif (contenant le gène LEU2 ou HIS3) est ségrégé des cellules par croissance en milieu riche YPG contenant de la leucine ou de l'histidine.

5

L'analyse physique des transformants Sigma::arg4-EcoRV est réalisée comme dans l'EXEMPLE 9 par séparation des chromosomes, transfert sur membrane de nylon et hybridation avec une sonde contenant le gène ARG4. Les résultats présentés en figure 17, montrent l'intégration du gène arg4-EcoRV sur différents chromosomes selon les transformants (Chr. XVI pour ORT1304 obtenu avec la souche MGD1312C ; Chr.IX pour ORT 1305 et Chr. XV ou VII pour ORT1306 obtenus à partir de la souche MGD131 102A).

10

Ces résultats montrent que le système utilisé "un gène inséré dans un élément Sigma" permet par cotransformation de disperser sans sélection une séquence d'intérêt dans le génôme. L'exemple montre l'intégration d'une séquence mutante d'un gène.

15

EXEMPLE 11

20 Transformations séquentielles de la souche MGD131 102A

a) par le fragment Sigma::ARG4 puis par le fragment Sigma::URA3.

Les transformants ARG⁺ ura⁻ ORT720 et ORT723 obtenus et caractérisés dans l'exemple 8 sont transformés par électroporation par l'ADN du fragment ClaI (Sigma::URA3) purifié après digestion du plasmide pBK617.

25

Les transformants URA⁺ obtenus sont sélectionnés sur milieu sans uracile. Ces transformants URA⁺ ont gardé la faculté de croître sur milieu sans arginine.

30

L'analyse de 5 surtransformants ARG4⁺ URA3⁺ (désignés par ORT720.6, 720.7, 720.8 et ORT723.8, 723.9) choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert sur membrane de nylon et hybridation du filtre obtenu à l'aide des sondes spécifiques ARG4 et URA3 (figure 18).

Les surtransformants ORT720.6, 720.7 et 720.8 portent au chromosome IX le gène ARG4 comme la souche ORT720 dont ils dérivent. D'autre part, ces surtransformants portent le gène URA3 respectivement au chromosome XII, VIII et IV.

Par ailleurs, les surtransformants ORT723.8, 723.9 portent au chromosome II le gène ARG4 comme la souche ORT723 dont ils dérivent et le gène URA3, respectivement au chromosome VIII et XII.

b) par le fragment Sigma::URA3 puis par le fragment Sigma::ARG4

De manière symétrique, le transformant URA⁺ arg⁻ ORT740 obtenu et caractérisé à l'exemple 7 est transformé par électroporation avec l'ADN du fragment HindIII (Sigma::ARG4 de 2,4 kb) purifié après digestion du plasmide pBK615.

Les transformants ARG⁺ obtenus sont sélectionnés sur milieu sans arginine. Ces transformants ont conservé la faculté de croître sur milieu sans uracile.

L'analyse de 3 surtransformants URA⁺ ARG⁺ (désignés par ORT740.1, 740.2, 740.3) choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert sur membrane de nylon et hybridation du filtre obtenu à l'aide des sondes spécifiques ARG4 et URA3 (figure 19).

On constate que ces trois surtransformants portent le gène URA3 au chromosome VIII comme la souche ORT740 dont ils dérivent et le gène ARG4 respectivement au chromosome IX, IV et XII.

Il est donc possible de la sorte d'obtenir par le système d'intégration proposé selon l'invention la dispersion de différents types de séquences dans la même cellule, à des loci différents et variables.

c) par les fragments Sigma::arg4.

* C1 Transformation de la souche ORT1305 contenant une copie Sigma::arg4-EcoRV par le fragment Sigma::arg4-BgIII.

5 (Sigma VIII.I* interrompu par le gène arg4-BgIII).

Afin de déterminer si une souche transformante obtenue par intégration d'une première cassette Sigma::arg4 pouvait être à nouveau transformée pour introduire une seconde cassette, le transformant primaire
10 ORT1305 contenant une séquence Sigma::arg4-EcoRV intégrée au chromosome IX a été retransformé par un fragment Sigma::arg4-BgIII. La souche ORT 1305 de génotype Sigma::arg4-EcoRV (chromosome IX), arg4 2060 (chromosome VIII), ura3-52, trp1, his3, ade2, Mata, a été cotransformée par le fragment Sigma::arg4-BgIII de 2,4 kb purifié après digestion du plasmide
15 pBK623 par l'enzyme HindIII et le plasmide réplcatif contenant le gène HIS3.

Les transformants HIS⁺ sont sélectionnés sur milieu sans histidine et analysés génétiquement par un test d'autopapillation pour identifier les cellules ayant gardé l'information arg4-EcoRV et acquis le marqueur
20 arg4-BgIII. Ces cellules qui sont toujours de phénotype arg⁻ ont désormais la capacité de générer par recombinaison au cours de la croissance végétative des cellules prototrophes ARG⁺ qui se multiplient sur un milieu sans arginine. L'analyse de quelques transformants appelés ORT1320-X, choisis au hasard, est réalisée par séparation de chromosomes, transfert et
25 hybridation du filtre obtenu à l'aide d'une sonde spécifique ARG4 (figure 20). Comme prévu, ces transformants présentent deux bandes d'hybridation, l'une au chromosome IX correspondant à la copie parentale arg4-EcoRV, l'autre dispersée sur les différents chromosomes correspondant à la copie nouvellement introduite (Chr. V, ORT1320-14; Chr. VIII, ORT1320-19,
30 ORT1320-27 et ORT1320-33; Chr.XV/VII, ORT1320-30 et Chr.I, ORT1320-34 pour les exemples de la figure 20).

Ces résultats démontrent la possibilité d'intégrer séquentiellement deux cassettes Sigma::arg4. Les cassettes Sigma::arg4-EcoRV et Sigma::arg4-BglII diffèrent de 6 paires de bases (2 paires de bases au niveau de la mutation arg4-EcoRV et 4 paires de bases au niveau de la mutation arg4-BglII) sur une longueur totale de 2400 nucléotides. Il est donc possible d'intégrer séquentiellement au moins deux copies d'un gène d'intérêt dans le génome de la levure par recombinaison homologue.

* C2- Transformation de la souche ORD1306-7D contenant deux copies Sigma::arg4-EcoRV par le fragment Sigma::arg4-BglII.
(Sigma VIII.I* interrompu par le gène arg4-BglII).

Le type d'expérience décrite ci-dessus (exemple 11, C1) a été réalisé à partir d'une souche parentale ORD1306-7D contenant deux copies Sigma::arg4-EcoRV afin de déterminer s'il était possible d'introduire une troisième copie Sigma::arg4.

La souche réceptrice ORD1306-7D de génotype Sigma::arg4-EcoRV (Chr.IX), Sigma::arg4-RV (Chr.XVI), arg4- 2060, his3, ura3-52, trp1, Mata a été obtenue par sporulation du diploïde ORD 1306 issu du croisement des souches ORT1304 et ORT1305 décrites dans l'EXEMPLE 10. Ceci démontre la possibilité d'introduire plusieurs copies de la cassette Sigma::gène par croisement des transformants et réassortiment des chromosomes en méïose.

La souche ORD1306-7D a été cotransformée avec le plasmide réplcatif HIS⁺ et le fragment Sigma::arg4-BglII purifié du plasmide pBK623 digéré par l'enzyme HindIII. Trois transformants HIS⁺ arg⁻ mais autopaillant (ARG⁺) sur un milieu sans arginine ont été obtenus. L'analyse de ces trois transformants par séparation de chromosomes, transfert et hybridation à l'aide d'une sonde ARG4, révèle pour chacun d'eux (figure 21), la présence de trois bandes d'hybridation correspondant aux deux bandes parentales (Chr.IX et XVI) et à une nouvelle bande, différente suivant les transformants, qui démontre l'insertion dispersée d'une troisième copie de la cassette Sigma::arg4 (Chr. II, ORT1327-21; Chr. IV ou XII, ORT1327-23 et Chr.XV ou VII, ORT1327-27).

Ces résultats démontrent que l'utilisation de la cassette Sigma::gène permet l'intégration par recombinaison homologue de plusieurs copies d'un gène d'intérêt par transformations séquentielles. L'isolement de ce type d'intégrants est réalisé par simple criblage génétique ou moléculaire.

5

EXEMPLE 12

Co-transformation de la souche de levure MGD131 102A par les fragments Sigma::ARG4 et Sigma::URA3

10 La souche MGD 131 102A arg4- Δ 2060 ura-52 est transformée par électroporation à l'aide d'un mélange d'ADN comportant :

- le fragment HindIII (Sigma::ARG4 de 2,4 Kb) purifié après digestion du plasmide pBK615
- le fragment ClaI (Sigma::URA3 de 1,4 Kb) issu de la restriction du plasmide pBK617.

15 Les transformants ARG⁺ sont sélectionnés sur milieu sans arginine et repiqués sur milieu sans uracile. De la sorte, on crible les co-transformants ARG⁺ URA⁺.

20 On effectue l'analyse de co-transformants ARG⁺ URA⁺ (désignés par ORT746, 747, 748, 749, 751, 752 et 753) par séparation de chromosomes, transfert sur membrane de nylon et hybridation du filtre obtenu à l'aide des sondes spécifiques URA3 et ARG4 (figure 22).

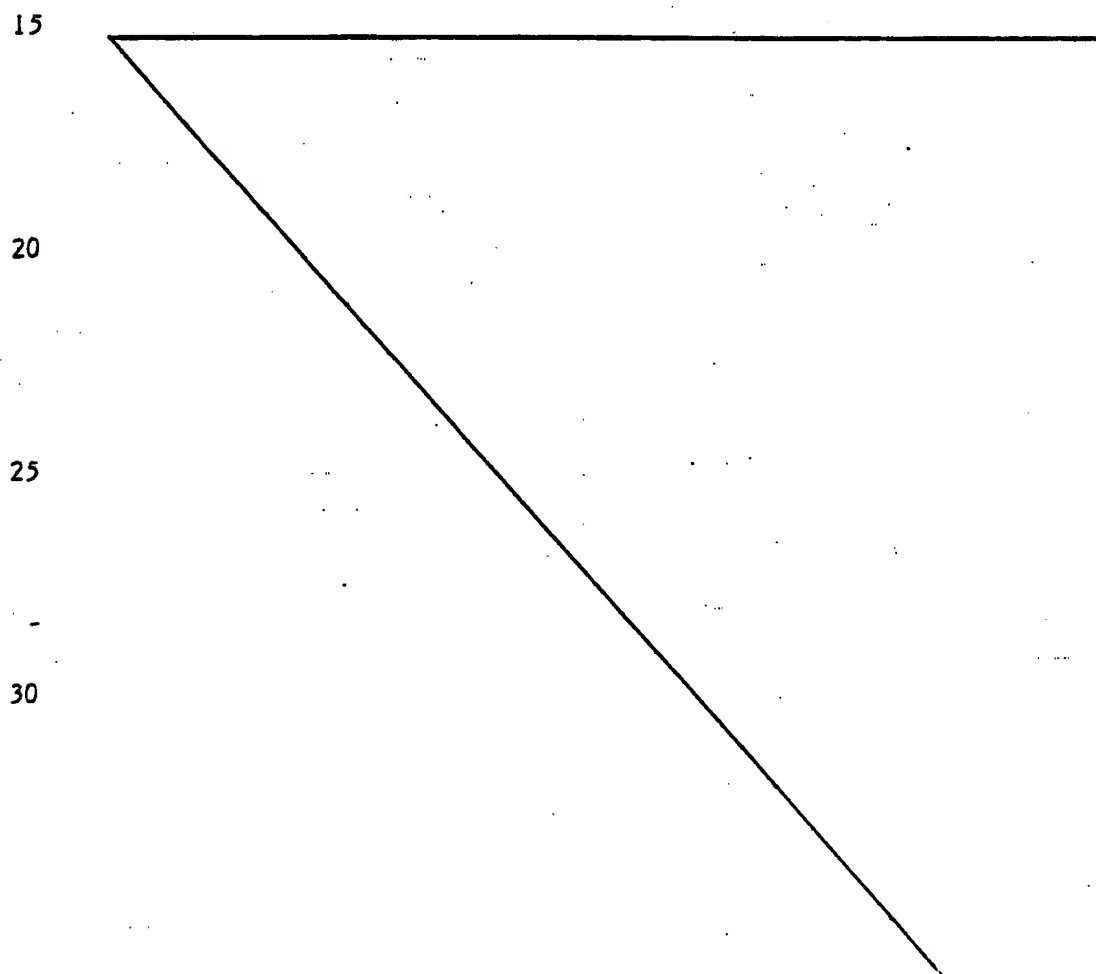
25 Il ressort de cette analyse que les gènes ARG4 et URA3 se retrouvent, dans chaque co-transformant, intégrés au même chromosome. Ce chromosome peut varier d'un co-transformant à l'autre. On trouve en effet les gènes ARG4 et URA3 au chromosome :

- XII pour ORT749
- IV pour ORT747
- XV ou VII pour ORT746, 748 et 753
- II pour ORT751
- 30 - XIV pour ORT752

BIBLIOGRAPHIE

- 1) J.B. Hicks, A. Hinnen and G.R. Fink: Properties of Yeast Transformation. Cold Spring Harbor Symposium on Quant. Biol; 43, 1305-1313 (1978).
- 5 2) T.S. Lopes, J. Klotwijk, A.E. Veenstra, P.C. van der Aar, H. van Heerikhuizen, H. A. Raué and R.J. Planta : High-copy-number integration into the ribosomal DNA of S.cerevisiae : a new vector for high-level expression ; Gene 79 : 199-206 (1989).
- 10 3) H.L. Klein: Recombination between Repeated Yeast Genes: p 355-422 in The Recombination of Genetic Material, Brooks Low Editor, Acad. Press (1988).
- 4) P.C. Van der Aar, T.S. Lopes, J. Klotwijk, P.H. Groeneveld, H.W. Van Versereld and A.H. Stouthamer : Consequences of phosphoglycerate kinase overproduct for the growth and physiology of S.cerevisiae ; Appl. Microbiol. Biotechnol 32 : 577(587 (1990).
- 15 5) J.D. Boeke, D.J.Garfinkel, C.A. Styles and G.R. Fink:TY Elements Transpose through an RNA Intermediate; Cell, 40: 491-500 (1985).
- 6) V.M. Williamson, E.T. Young and M. Ciriacy: Transposable Elements Associated with Constitutive Expression of Alcohol Dehydrogenase; Cell, 23: 605-614 (1981).
- 20 7) D.T. Chaleff and G.R. Fink: Genetic Events Associated with an Insertion Mutation in Yeast; Cell, 21: 227-237 (1980).
- 8) D. J. Clark, V.W. Bilanchone, L.J. Haywoods, S.L. Dildine and S.B. Sandermeier: A Yeast Sigma Composite Element, TY3, has Properties of a Retransposon; J.Bio.Chemist. 263: n°3, 1413-1423 (1988).
- 25 9) F.S. Genbauffe, E.C. Chisholm and T.G. Cooper: Tau, Sigma and Delta. J.Bio.Chem. 259: 10518-10525 (1984).
- 10) A. Eigel and H. Feldann: Tyl and Delta Elements Occur Adjacent to Several tRNA Genes in Yeast. EMBO J. 1: n°10, 1245-1250 (1982).
- 30 11) S.B. Sandmeyer, V.W. Bilanchone, D.J. Clark, P. Morcos, G.F. Carle and G.M. Brodeur: Sigma Elements are Position-Specific for Many Different Yeast tRNA Genes. Nucleic Acids Res. 10: 1499-1515 (1988).

- 12) H.T. Wang, S. Frackman, J.Kowalisyn, R.E. Esposito and R. Elder :
Developmental Regulation of SPO13, a Gene required for Separation of
Homologous Chromosomes at Meiosis. Mol. Cell. Biol. 7: n°4, 1425-1435
(1987).
- 5 13) M.L. Bach, F. Lacroute and D. Botstein : Evidence for transcriptional
regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by
hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in
Escherichia coli Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:386-390 (1979).
- 10 14) Nicolas, A., Treco, D., Schultes, N., and Szostak, J. : An initiation site for
meiotic gene conversion in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Nature
338, 35-39 (1989).



LEGENDES RELATIVES AUX FIGURES

Légende relative à la figure 1

5

LTR : Long Terminal Repeat
Delta pour Tyl et TyII (332 bp)
Sigma pour TyIII (341 bp)

10

 : Internal Inverted Repeat (8 bp)

 Duplication de 5bp de la cible

15

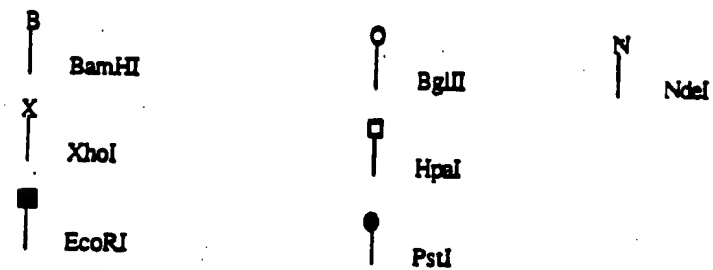
TyA : Homologue du gène gag des rétrovirus

TyB : Homologue du gène pol des rétrovirus

20

Légende relative à la figure 2

25



30

35

 Séquences SIGMA

Légende relative à la figure 3



Séquences inversées répétées du SIGMA



Séquences dupliquées de la cible d'intégration du TYIII.



Limites du gène codant pour l'ARNt Ala.



Localisation de l'anticodon AGC de l'ARNt.

Sous la séquence sont annotées les différences constatées avec la séquence SIGMA la plus fréquemment obtenue.

Légende relative à la figure 5



Oligonucléotides mutagènes



Séquences génomiques du chromosome VIII




Séquences du Sigma





Séquence inversées répétées

Légende relative à la figure 7

	Ap	Apal	Bh	BamHI	Bg	BglII
5	Bx	BstXI	E	EcoRI	Ev	EcoRV
	HIII	HinDIII	Hp	HpaI	Kp	Knpl
10	Nd	NdeI	Nt	Not/EagI	Sa	Sall
	SI	SacI	SII	SacII	Sm	SmaI
15	Xb	XbaI	Xh	XhoI		

20  Séquences du sigma

  Séquences inversées répétées

25

Légende relative à la figure 8

30  Séquences inversées répétées du SIGMA.

35

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Légende relative à la figure 9

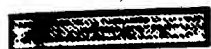
5

Ap	ApaI	Bh	BamHI	Bg	BglII
Bx	BstXI	E	EcoRI	Ev	EcoRV
HIH	HinDIII	Hp	HpaI	Kp	Knpl
Nd	NdeI	Nt	Not/EagI	Sa	SalI
SI	SacI	SII	SacII	Sm	SmaI
Xb	XbaI	Xh	XhoI		

10

15

20



Séquences du sigma



Séquences inversées répétées

25

30

35

REVENDICATIONS

1. Cassette d'intégration multisite dans le génome d'une levure, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins :
 - une séquence d'intégration présentant de l'homologie avec une séquence
 - 5 "non essentielle" naturellement répétée et dispersée dans le génome de la levure,
 - une séquence d'intérêt.
2. Cassette d'intégration multisite selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite séquence d'intégration est une séquence
- 10 présentant de l'homologie avec une séquence type Solo LTR d'une levure, notamment du genre Saccharomyces.
3. Cassette d'intégration multisite selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite séquence type Solo LTR est choisie parmi les Solo LTR de S. cerevisiae.
- 15 4. Cassette d'intégration multisite selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite séquence type Solo LTR est la séquence Solo Sigma de S. cerevisiae.
5. Cassette d'intégration multisite selon la revendication 4, caractérisée en ce que ladite séquence Solo Sigma est la séquence Solo
- 20 Sigma localisée sur le chromosome VIII de S. cerevisiae à proximité du gène ARG4.
6. Cassette d'intégration multisite selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt est clonée à l'intérieur de ladite séquence d'intégration.
- 25 7. Cassette d'intégration multisite selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt peut être ciblée par recombinaison homologue vers les séquences naturellement répétées présentant l'homologie.
8. Souche de levure transformée par une cassette d'intégration
- 30 multisite selon l'une des revendications précédentes.
9. Souche de levure du genre Saccharomyces caractérisée en ce qu'elle contient dans son génome au moins une séquence d'intérêt intégrée en une seule copie dans au moins une séquence naturellement répétée et dispersée de son génome, au site de ladite séquence naturellement répétée.

35

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10. Souche de S.cerevisiae caractérisée en ce qu'elle contient dans son génome au moins une séquence d'intérêt intégrée dans au moins une séquence Solo Sigma, au site de ladite séquence Solo Sigma.

5 11. Procédé de préparation d'un produit d'intérêt par une levure du genre Saccharomyces, selon lequel :

- on transforme une levure du genre Saccharomyces par une cassette d'intégration selon l'une des revendications 1 à 7,
- on met en culture la levure ainsi transformée, et
- on récupère le produit obtenu.

10 12. Procédé de préparation de plusieurs produits d'intérêt par une levure du genre Saccharomyces selon lequel :

- on transforme successivement une levure du genre Saccharomyces par une cassette d'intégration selon l'une des revendications 1 à 7, comportant chacune, en tant que séquence d'intérêt, une séquence d'ADN codant pour

15 l'un des produits d'intérêt, ou

- on transforme une levure du genre Saccharomyces par une cassette d'intégration selon l'une des revendications 1 à 7, comportant plusieurs séquences d'intérêt codant chacune pour l'un des produits d'intérêt, et

- on met en culture la levure ainsi transformée, et
- 20 - on récupère lesdits produits d'intérêt.

13. Procédé de préparation de plusieurs produits d'intérêt par une levure du genre Saccharomyces selon l'une des revendications 11 et 12, dans lequel

- 25 - on réalise la cotransformation d'une levure du genre Saccharomyces par au moins deux cassettes d'intégration selon l'une des revendications 1 à 7, comportant chacune, en tant que séquence d'intérêt, au moins une séquence d'ADN codant pour l'un des produits d'intérêt,
- on met en culture la levure ainsi transformée, et
- on récupère lesdits produits d'intérêt.

30

35

1/24

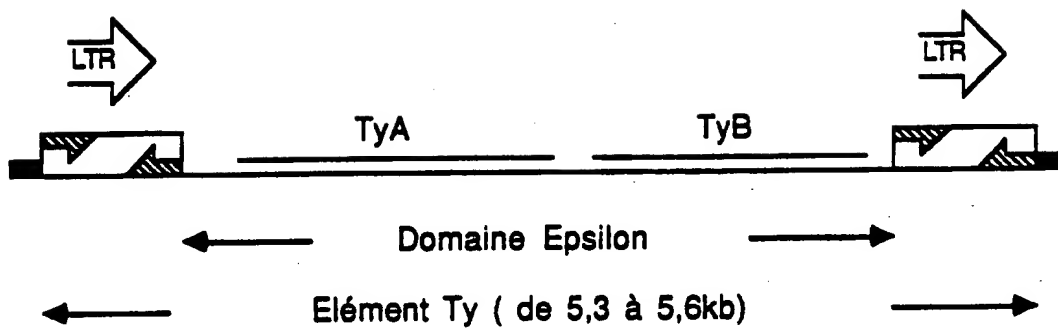


Fig.1

2/24

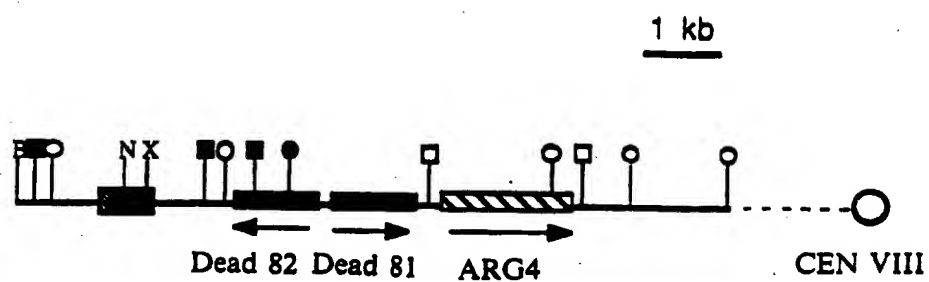


Fig.2

3/24

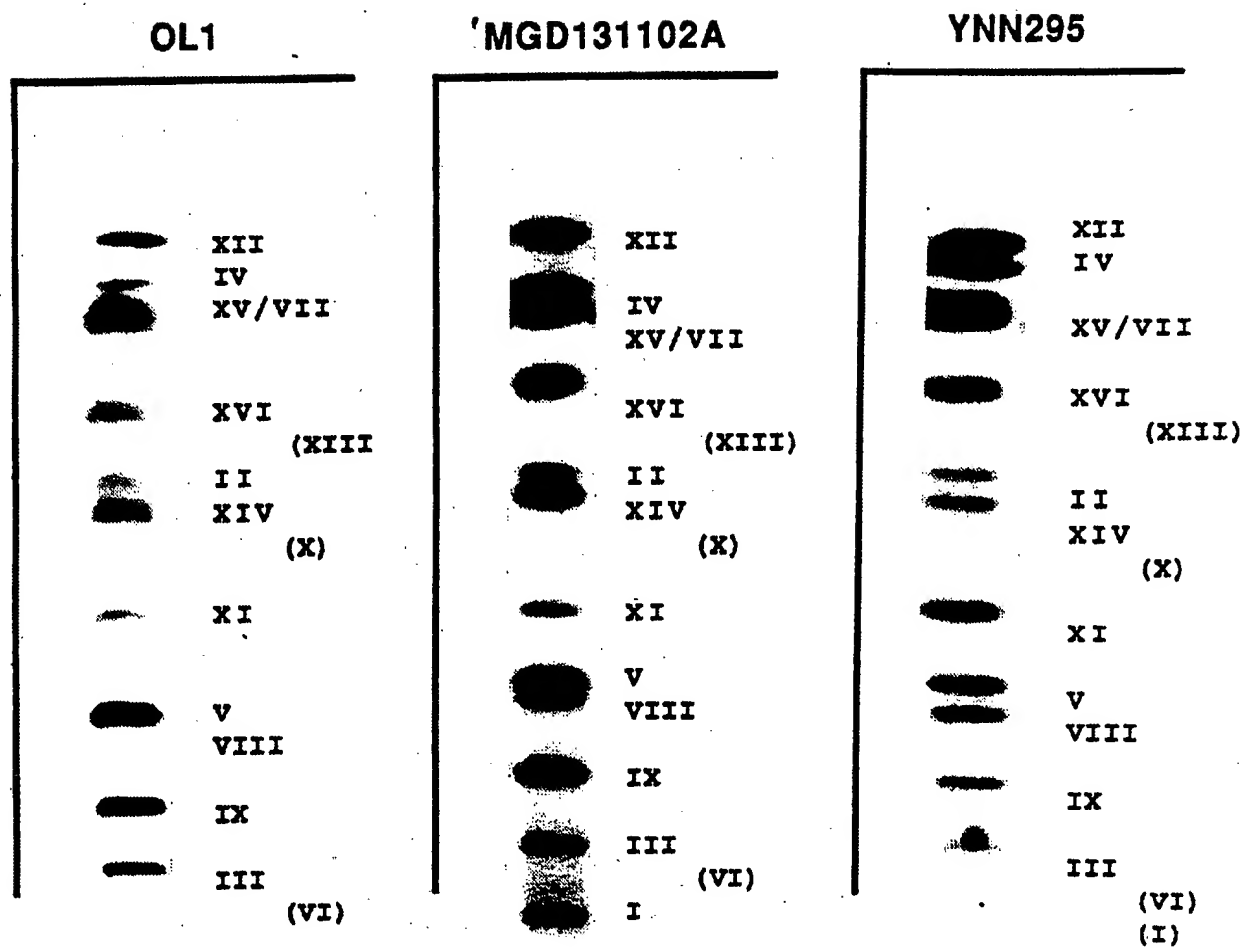
TATAATTTTCATGTATAGAGTTTTTATTTGTGCTTTTATCTTTCTAAA 50
AATCAAATATCATCATCATTTTCAAATAATGTTTCCGCTATTAAATGTAC 100
CTTACCATGTTGACAGCTTATACATTAACAGACCTTTATAGTACTGTTAT 150
GGTAATAACAAAAAGATTGGACGAGTCCGGAATCGAACCGGAGACCTCT 200
CCCATGCTAAGGGAGCGCGCTACCGACTACGCCACACGCCCTGATATTTG 250
TTGAATGTGTTGTATTACGGGCTCGAGTAATACCGGAGTGTCTTGACAAT 300
CCTAATCTGAACAGTCTTAGGGAAGTAACCAGTTGTCAAACGGTTTATC 350
AGATTAATTCACGGAATGTTACTTATCTTATATATTATATAAAATATGAA 400
TCATACTAAGTGTTGGAAGCGCGGAATCTCGGATCTAACTAATTGTTCA 450
GGCATTTATACTTTTGGGTAGTTTCAGCTAGGGAAGGACGGGTTTTGTCTC 500
ATGTTGTTTCGTTTTGTTATAAGGTTGTTTCATATGTGTTTTATGAACGTT 550
TAGGATGACGTATTGTCATACTGACGTATCTCATTTTGAGATACAACAGA 600
ATGACTGGTATTAAAGAAATAAGGAATACCATA 633

Diagrammatic features:
- A box highlights the sequence **CCCATGCTA** at position 250.
- An arrow points to the sequence **TTGAATGTGTTGTATTACGGGCTCGAGTAATACCGGAGTGTCTTGACAAT** at position 300.
- The restriction site **XhoI** is indicated between positions 300 and 350.
- A hatched box is located below the sequence **TTGAATGTGTTGTATTACGGGCTCGAGTAATACCGGAGTGTCTTGACAAT** at position 300.
- The restriction site **NdeI** is indicated between positions 550 and 600.
- A hatched box is located below the sequence **TAGGATGACGTATTGTCATACTGACGTATCTCATTTTGAGATACAACAGA** at position 600.
- The sequence **ATGACTGGTATTAAAGAAATAAGGAATACCATA** at position 633 is underlined.

Fig. 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4 / 24

Fig. 4

5/24

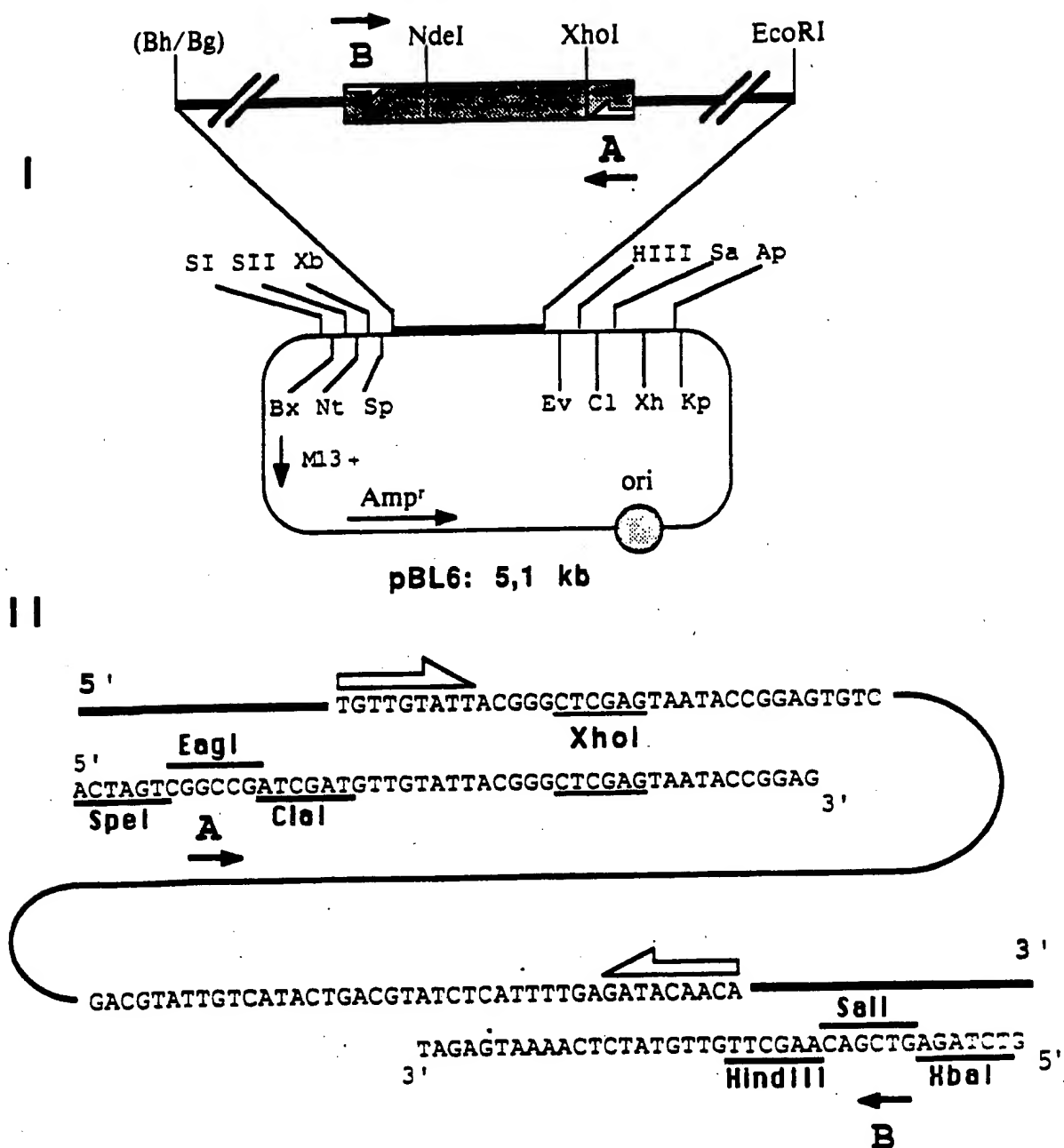
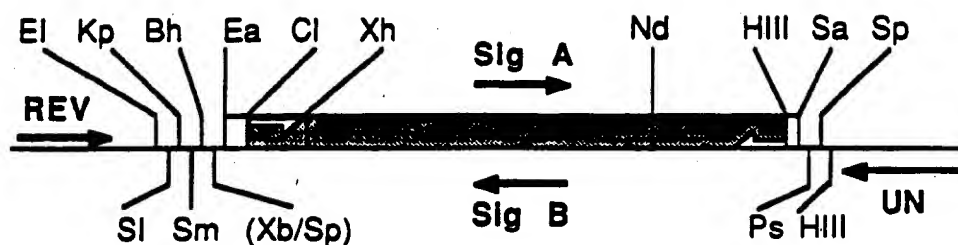


Fig. 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT

6/24

I



pBK605: 7,3kb

II

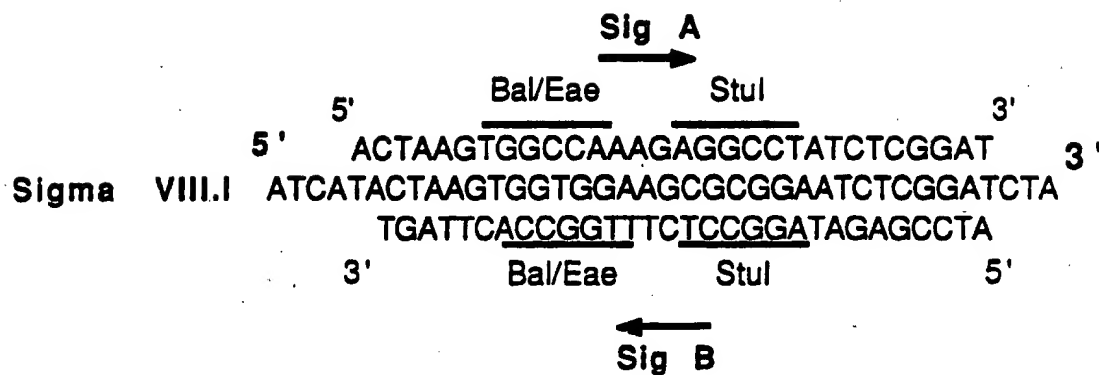
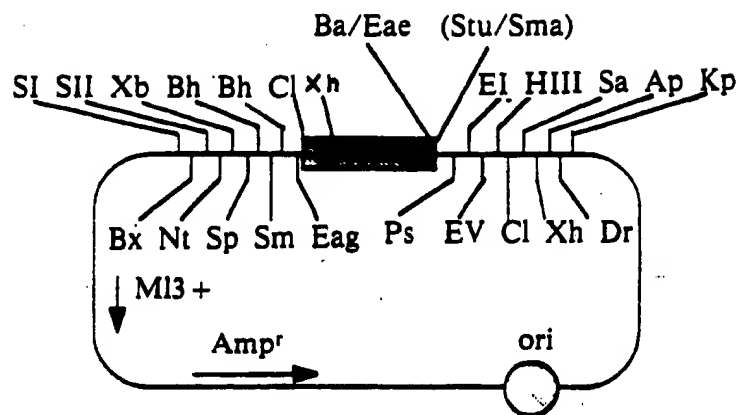
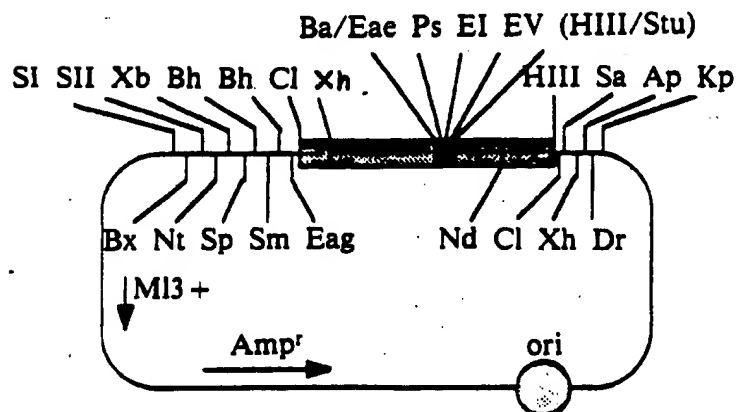


Fig.6

7/24



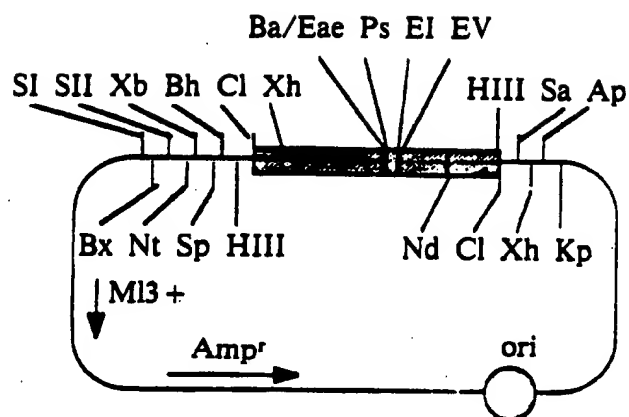
pBK609 : 3,15kb

Fig.7a.

pBK610 : 3,3 kb

Fig.7b.**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

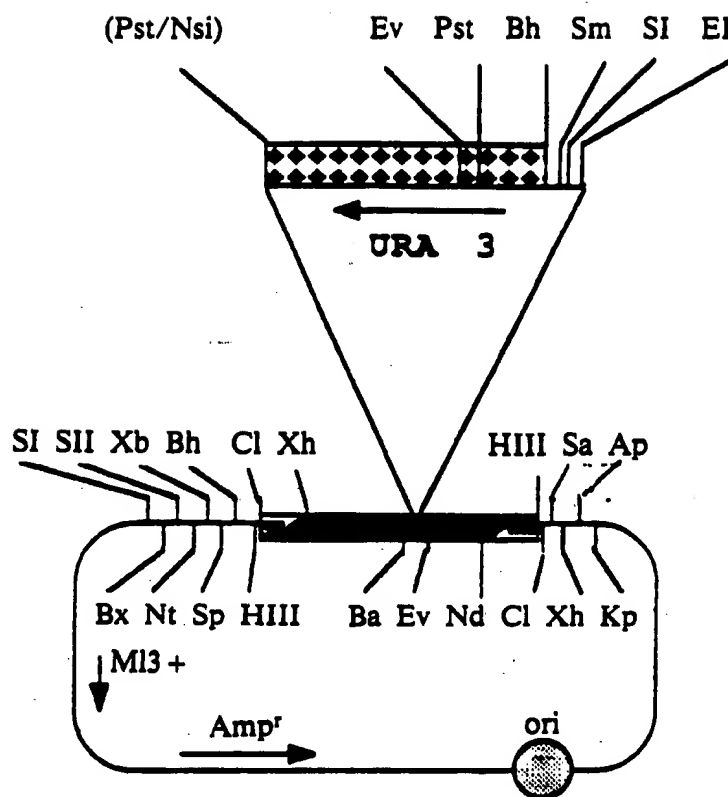
8/24



pBK614 : 3,3 kb

Fig.7c.

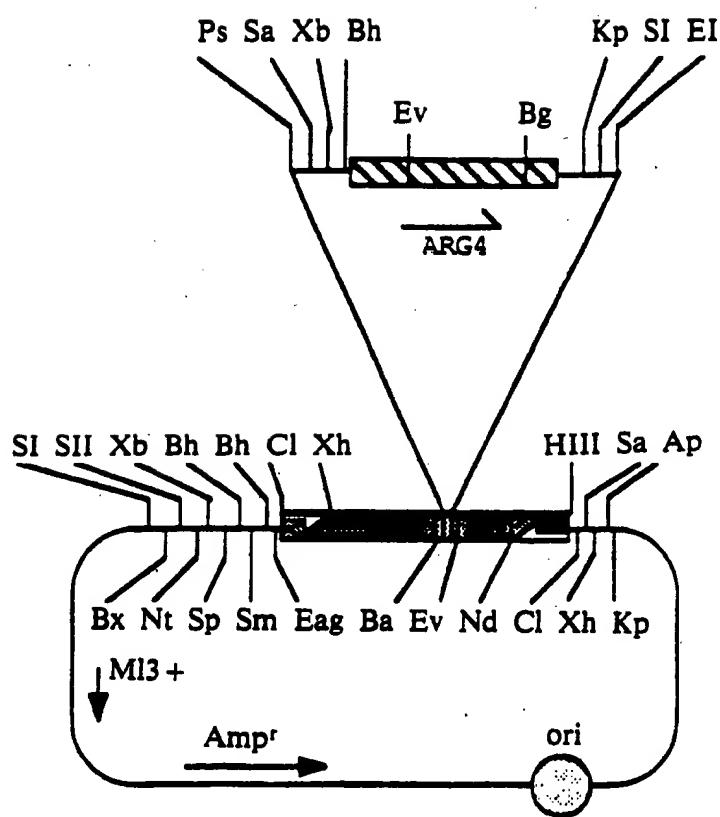
10/24



pBK617: 6, 7 kb

Fig. 9

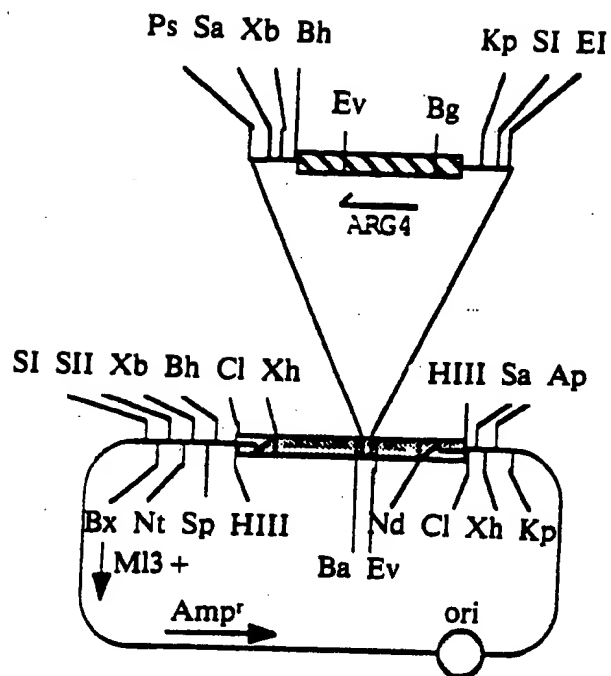
11/24



pBK611 : 5.3 kb

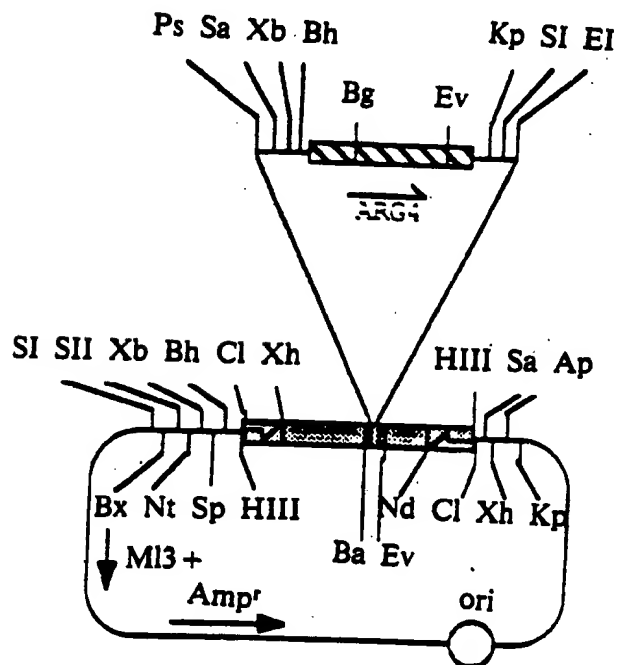
Fig.10a.

FEUILLE DE REMPLACEMENT



pBK615 : 5,3kb

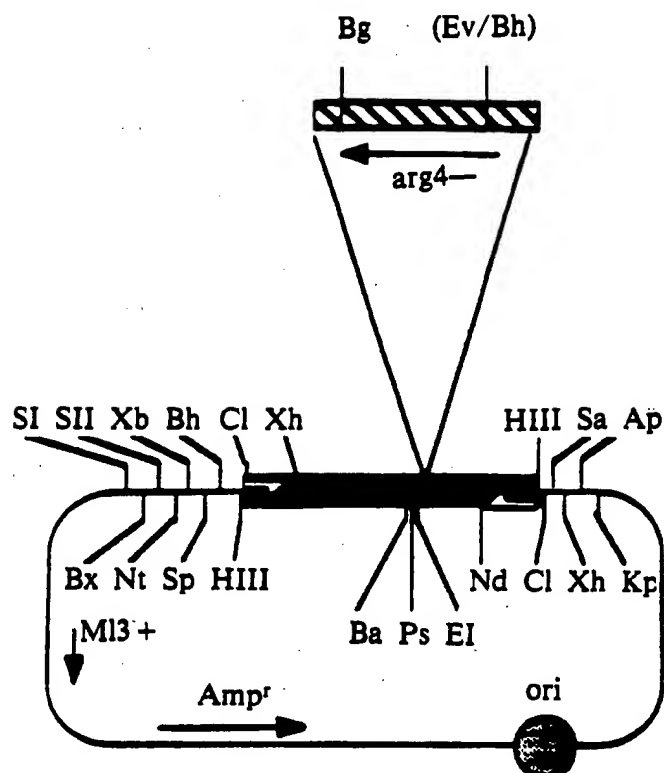
Fig.10 b



pBK616 : 5,3 kb

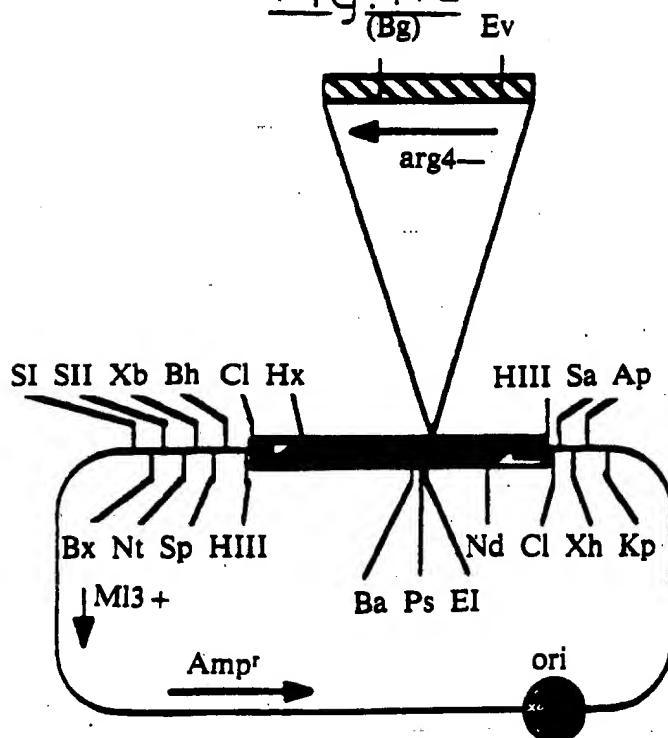
Fig.10 c

13/24



pBK 620

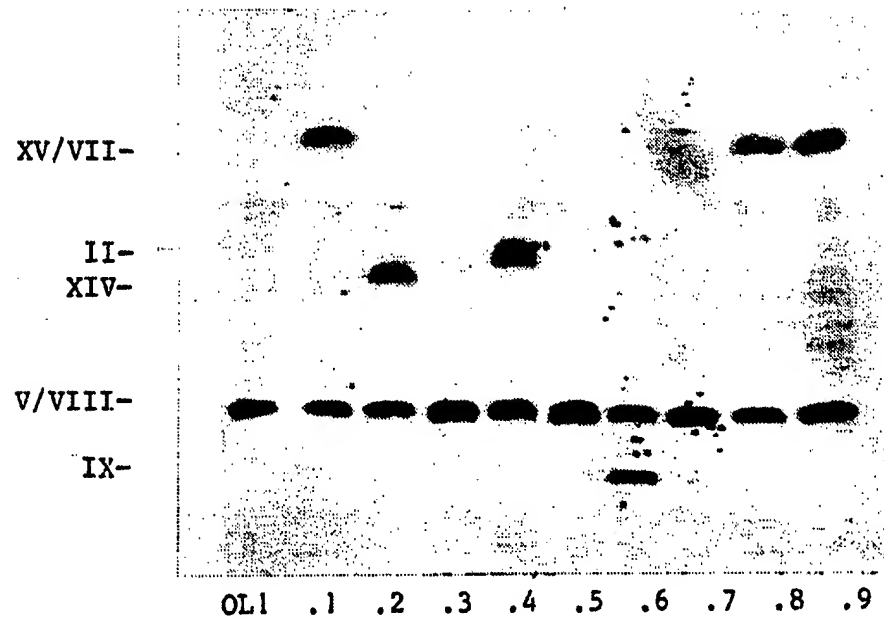
Fig. 11a



pBK 623

Fig. 11b

14/24

Fig.12

FEUILLE DE REMPLACEMENT

15/24

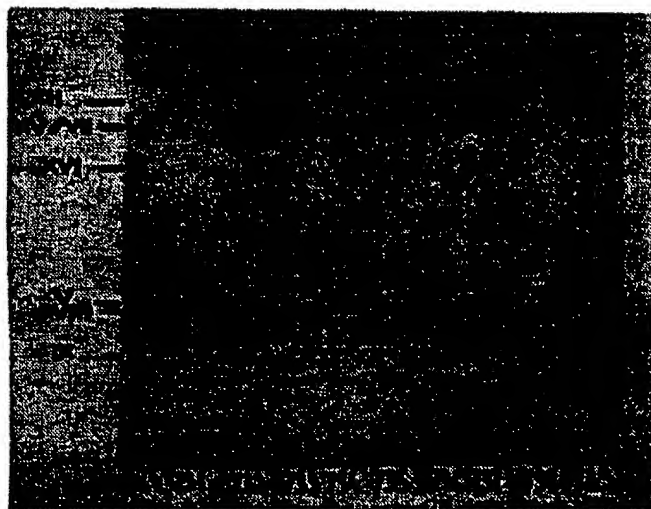


Fig.13

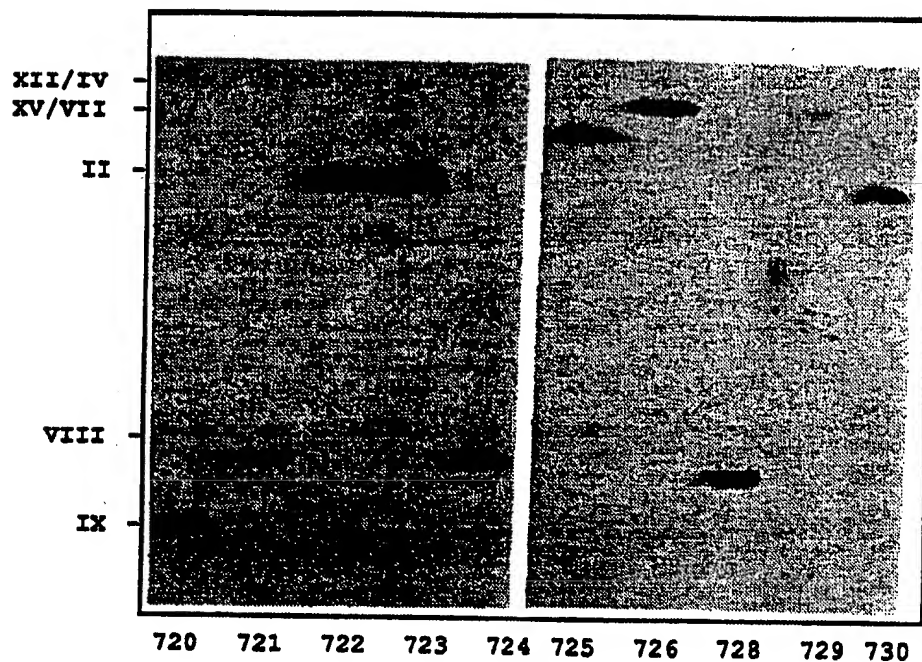


Fig.14

17/24

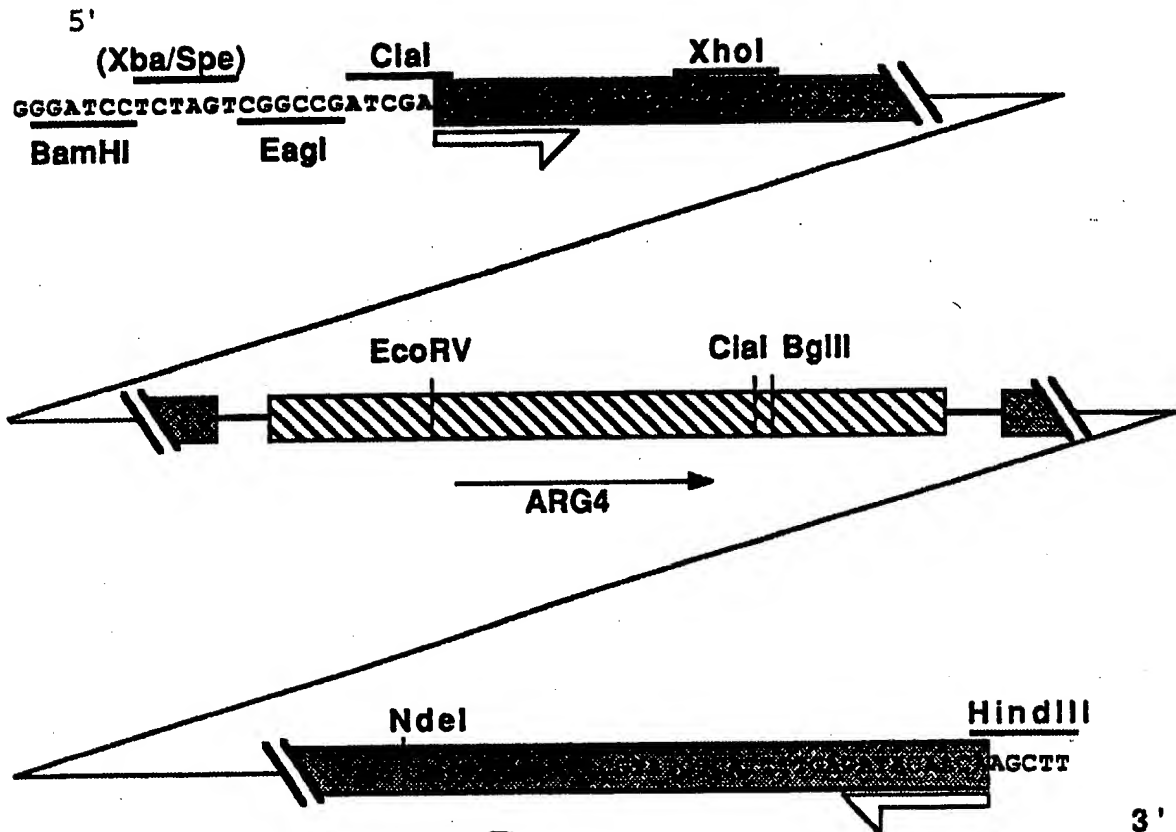


Fig.15 a

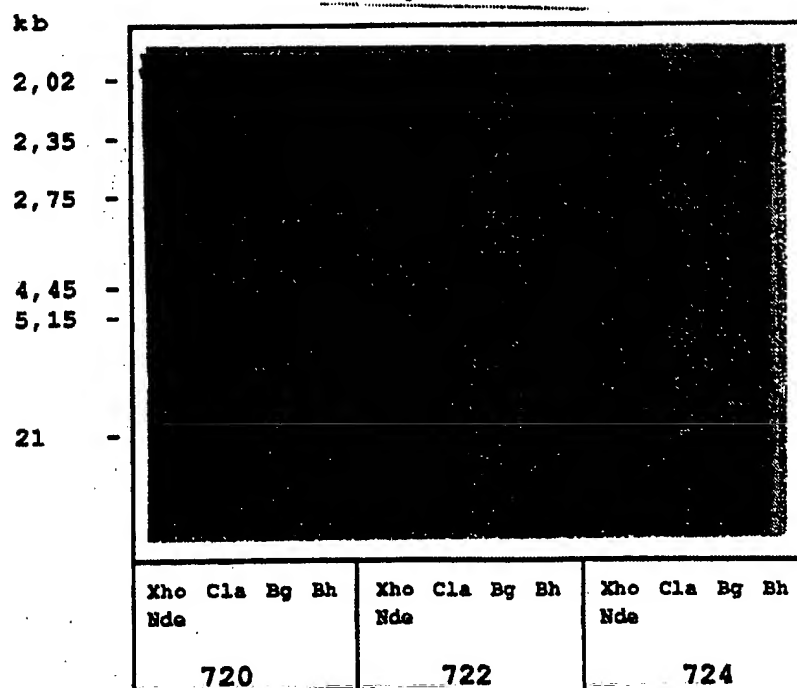


Fig.15 b

18/24

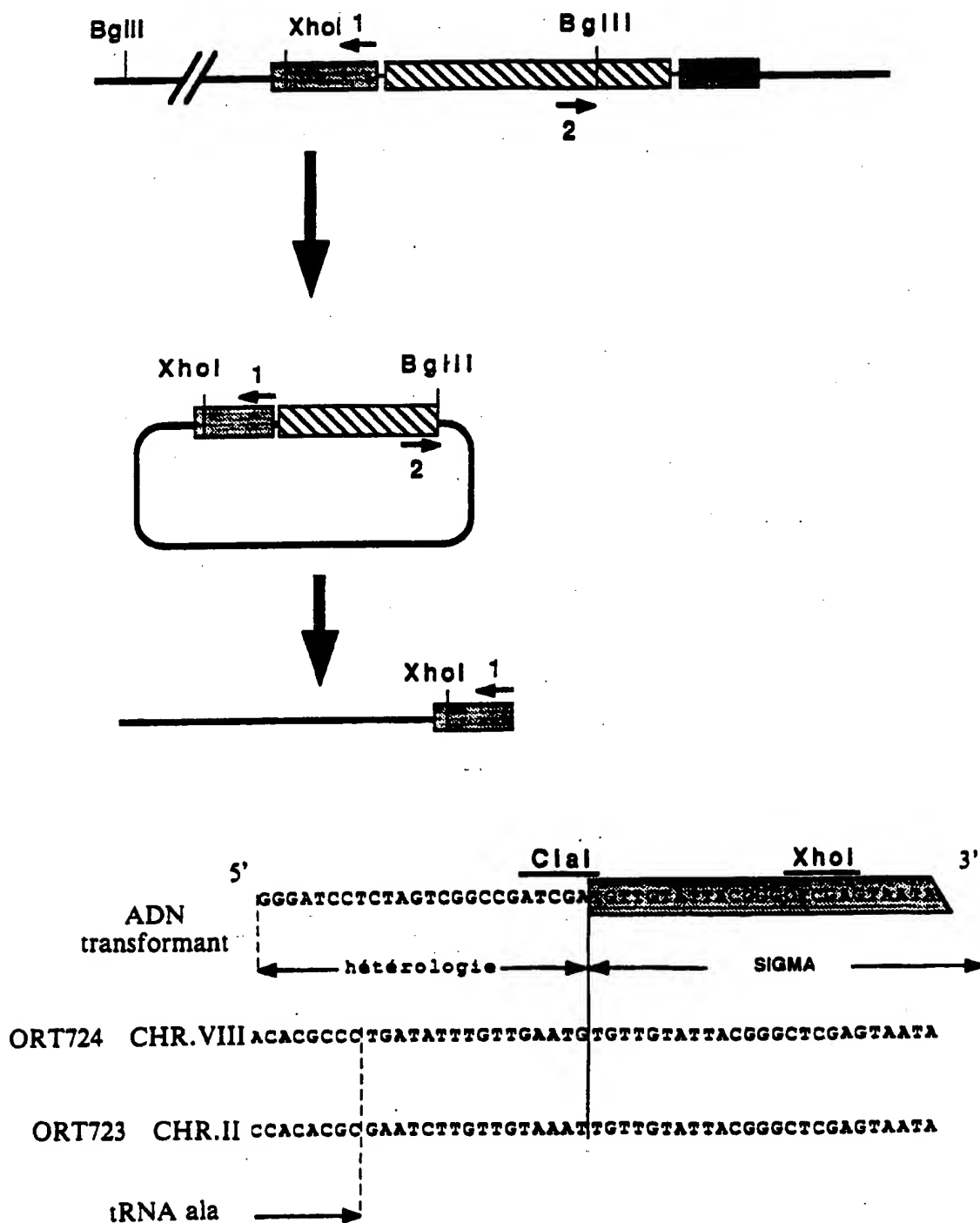


Fig.16

FEUILLE DE REMPLACEMENT

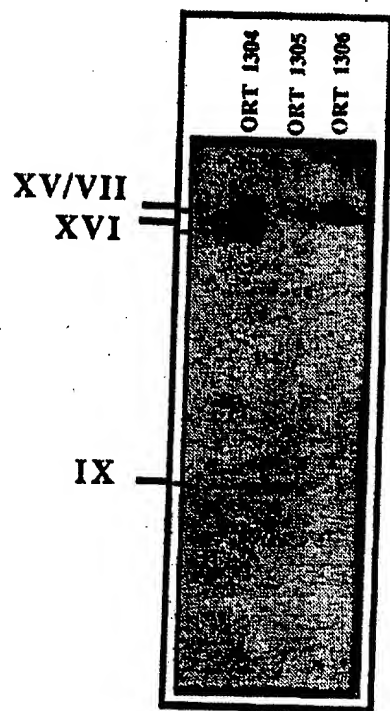


Fig.17

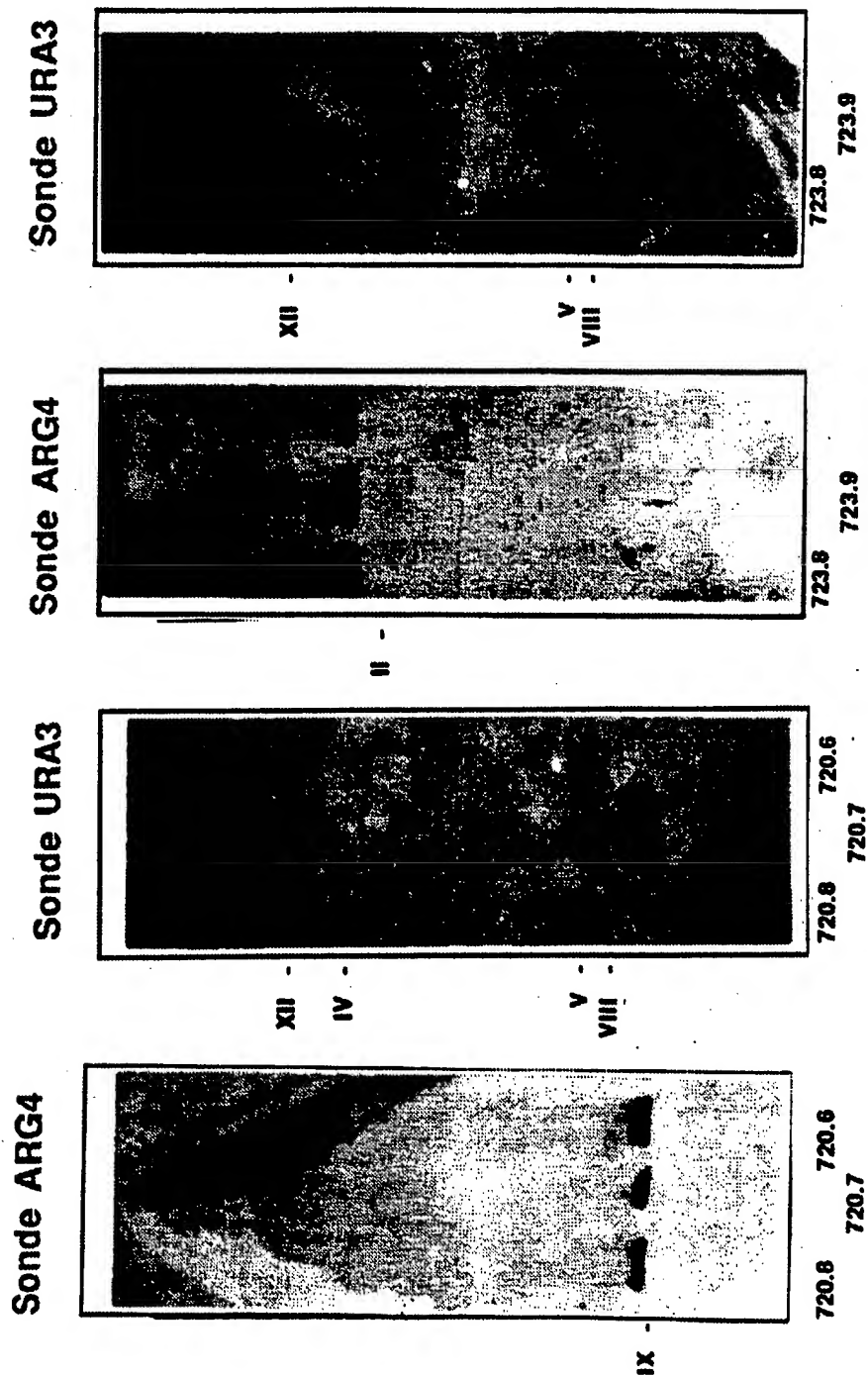
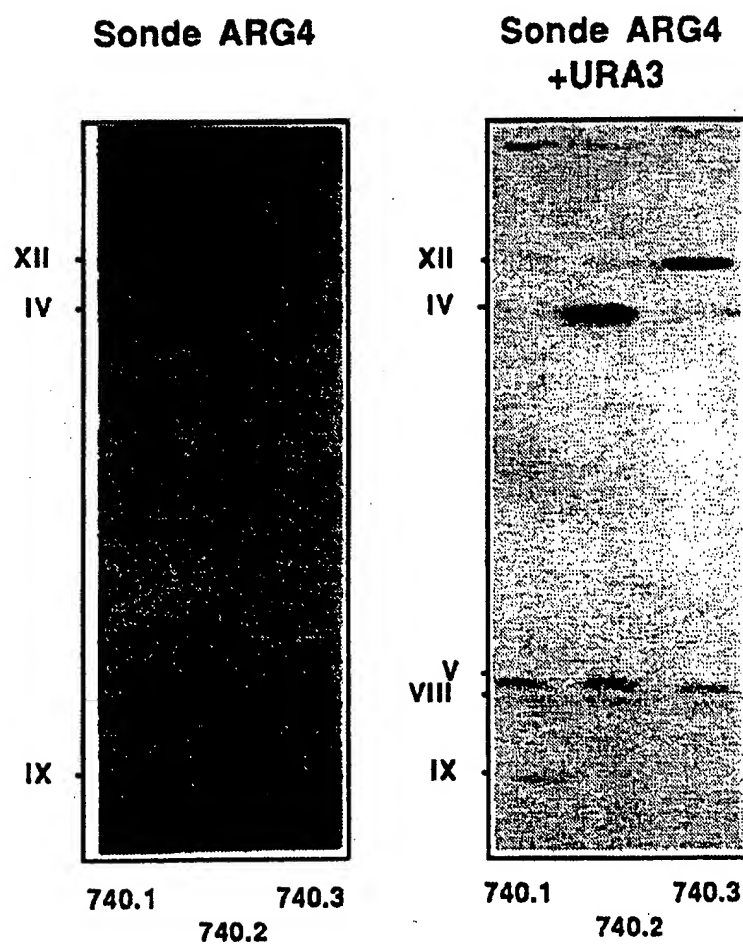


Fig. 18

21/24

Fig.19**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

22/24

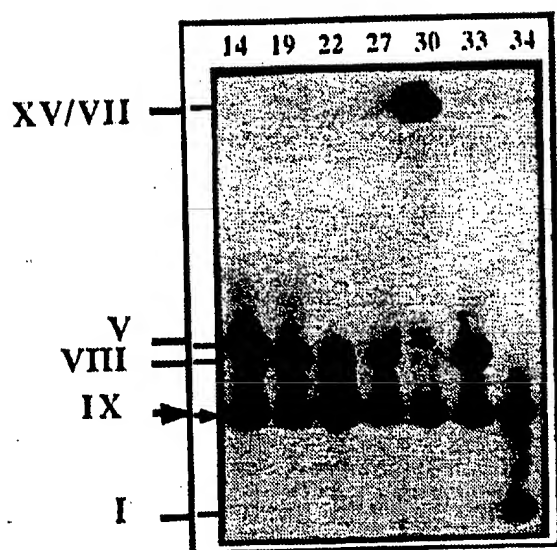


Fig. 20

23/ 24

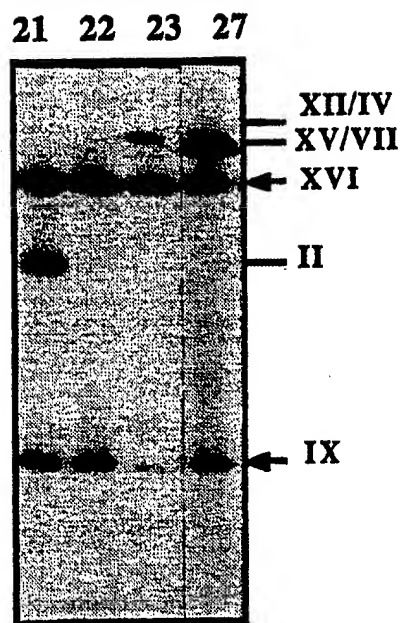


Fig. 21

24/24

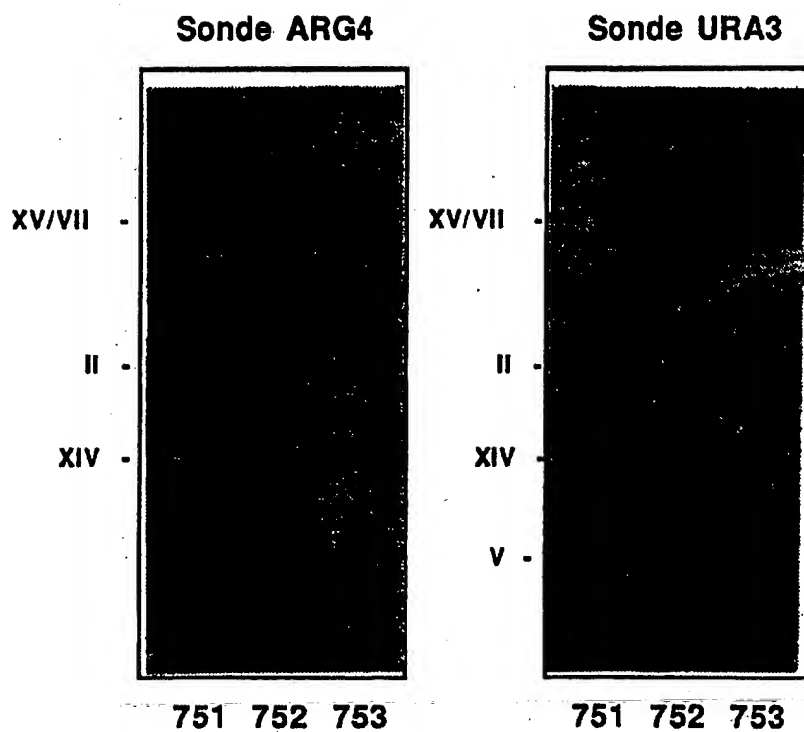
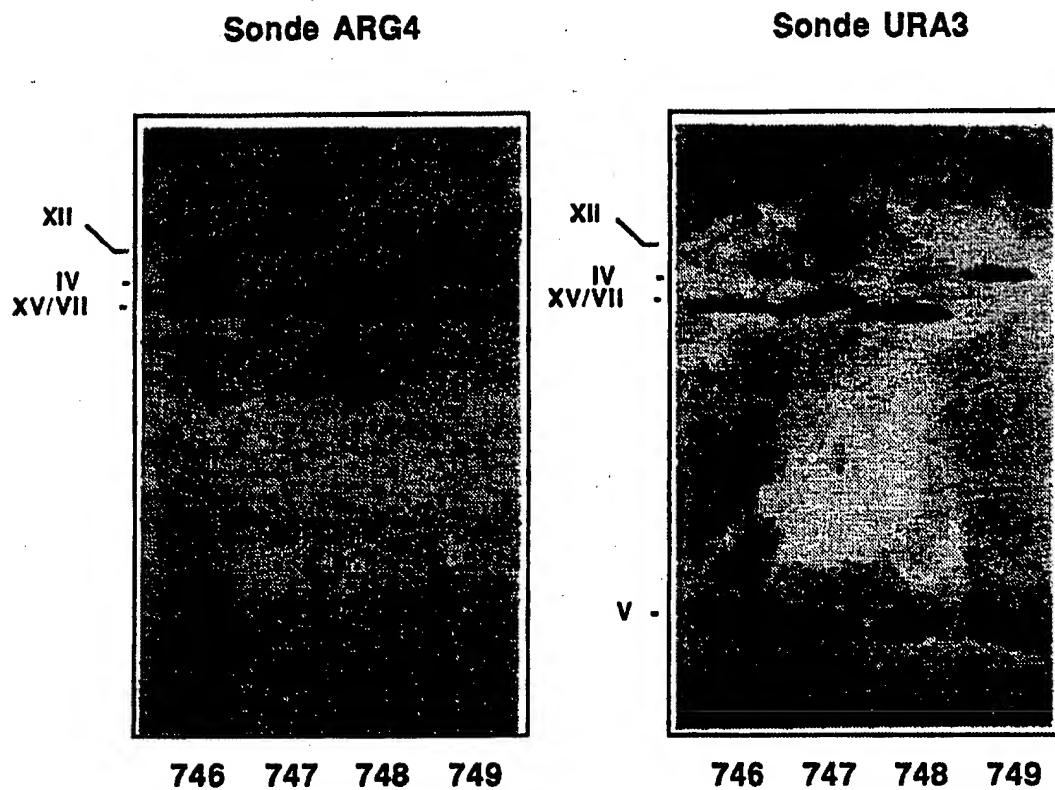


Fig. 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR91/01008

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl.5	C12N 15/81;	C12P 21/02; C12N 1/19
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
Int.CL.5	C12N; C07K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	WO, A, 8 803 169 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 5 May 1988 see claim 10 ---	1-11
X	EP, A, 0 310 586 (SMITH-KLINE RIT SA) 5 April 1989 see abstract ---	1-11
X	WO, A, 9 005 787 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 31 May 1990 see claim 1 ---	1-11
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. Vol. 17, No. 5, 1989, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 1865-1878; F. CREUSOT ET AL: 'A novel tRNA(Ala) gene and its adjacent sigma element downstream from the CYP1 (HAP1) gene in Saccharomyces cerevisiae' ---	5
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. Vol.16, No. 4, 1988, ARLINGTON, VIRGINIA US; pages 1499-1515; S.B. SANDMEYER ET AL: 'Sigma elements are position-specific for many different yeast tRNA genes' -----	2-4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
29 April 1992 (29.04.92)	14 May 1992 (14.05.92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9101008
SA 55131**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 29/04/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8803169	05-05-88	AU-A- 8171087	25-05-88
EP-A-0310586	05-04-89	AU-A- 2246188	13-04-89
		JP-A- 1157393	20-06-89
WO-A-9005787	31-05-90	AU-A- 4665389	12-06-90
		CA-A- 2003695	23-05-90
		EP-A- 0445227	11-09-91

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 91/01008

Demande Internationale No

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> CIB 5 C12N15/81; C12P21/02; C12N1/19 </div>		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; C07K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	WO,A,8 803 169 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 5 Mai 1988 voir revendication 10 ---	1-11
X	EP,A,0 310 586 (SMITH-KLINE RIT SA) 5 Avril 1989 voir abrégé ---	1-11
X	WO,A,9 005 787 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 31 Mai 1990 voir revendication 1 ---	1-11
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 17, no. 15, 1989, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 1865 - 1878; F. CREUSOT ET AL.: 'A novel tRNA(Ala) gene and its adjacent sigma element downstream from the CYP1 (HAP1) gene in Saccharomyces cerevisiae' --- -/-	5
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹¹ Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
29 AVRIL 1992	24.05.92	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	VAN PUTTEN A.J.	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 16, no. 4, 1988, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 1499 - 1515; S.B. SANDMEYER ET AL.: 'Sigma elements are position-specific for many different yeast tRNA genes'	2-4

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9101008
SA 55131

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 29/04/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-8803169	05-05-88	AU-A- 8171087	25-05-88
EP-A-0310586	05-04-89	AU-A- 2246188	13-04-89
		JP-A- 1157393	20-06-89
WO-A-9005787	31-05-90	AU-A- 4665389	12-06-90
		CA-A- 2003695	23-05-90
		EP-A- 0445227	11-09-91

EPO FORM P0072

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.